

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

BIANCA SCHNECK SIMÃO

**GRAU DE CONCORDÂNCIA ENTRE A IMUNOCROMATOGRAFIA E A PCR
PARA DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO PELO VÍRUS DA PANLEUCOPENIA
FELINA (FPV)**

PORTO ALEGRE

2022

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**GRAU DE CONCORDÂNCIA ENTRE A IMUNOCROMATOGRAFIA E A PCR
PARA DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO PELO VÍRUS DA PANLEUCOPENIA
FELINA (FPV)**

Autora: Bianca Schneck Simão

**Trabalho apresentado à Faculdade de
Veterinária como requisito parcial para
a obtenção da graduação em
Medicina Veterinária**

Orientadora: Ana Paula Ravazzolo

Coorientador: Cláudio Wageck Canal

PORTO ALEGRE

2022

CIP - Catalogação na Publicação

Simão, Bianca Schneck

Gráu de concordância entre a imunocromatografia e a PCR para diagnóstico de infecção pelo vírus da panleucopenia felina (FPV) / Bianca Schneck Simão. -- 2022.

41 f.

Orientadora: Ana Paula Ravazzolo.

Coorientadoras: Cláudio Wageck Canal, Fernanda Vieira Amorim da Costa.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Curso de Medicina Veterinária, Porto Alegre, BR-RS, 2022.

1. FPV, panleucopenia, imunocromatografia, PCR.. I. Ravazzolo, Ana Paula, orient. II. Canal, Cláudio Wageck, coorient. III. da Costa, Fernanda Vieira Amorim, coorient. IV. Título.

Bianca Schneck Simão

GRAU DE CONCORDÂNCIA ENTRE A IMUNOCROMATOGRAFIA E A PCR PARA
DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO PELO VÍRUS DA PANLEUCOPENIA FELINA (FPV)

Aprovado em 11 MAIO 2022

APROVADO POR:

Profª. Dra. Ana Paula Ravazzolo
Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Cláudio Wageck Canal
Laboratório de Virologia Veterinária
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profª. Dra. Gabriela Schaefer
Serviço de Medicina de Felinos do Hospital de Clínicas Veterinárias (MedFel)
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profª. Dra. Ana Cláudia Franco
Laboratório de Virologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS)
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

AGRADECIMENTOS

Este trabalho é dedicado a todas as pessoas que acreditaram em mim. Especialmente, à minha mãe Vera e minha irmã Débora, que me deram muito amor e confiaram nas minhas capacidades, me apoiaram em momentos difíceis e tornaram possível a chegada até aqui. Às minhas melhores amigas Tayná e Francini, que mesmo de longe foram um apoio essencial. Sem essas mulheres nada disso teria sido possível.

Vivemos em um país que discrimina as minorias que conquistam vagas em universidades, e que recebem auxílios do governo para ter uma vida mais digna. Mas, apesar das dificuldades e tendo que se dedicar de maneira redobrada, algumas exceções conseguem competir com alunos privilegiados. Durante minha trajetória, recebi muitas críticas difíceis, mas que me deram mais vontade de conquistar meu diploma. Espero conseguir devolver para a sociedade tudo o que aprendi e conquistei através da educação pública de qualidade. Por isso, agradeço também à PRAE, ao ProUni e ao CNPq, que me proporcionaram ingressar na faculdade, me manter financeiramente e realizar pesquisas. E também a todas as pessoas que me ajudaram de alguma maneira a concluir este ciclo.

Agradeço à professora Ana Paula Ravazzolo, pois tive muita sorte em tê-la no meu caminho durante a graduação. Cumpre lindamente seu papel como educadora e foi muito importante na minha formação, desde os tempos em que fui bolsista no Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular, sendo meu norte para que esse trabalho pudesse ser concluído. Ao professor Cláudio Canal, que me deu suporte para que várias decisões pudessem ser tomadas neste trabalho, e que além de professor é um grande conselheiro para seus orientados. E à professora Fernanda Amorim, minha referência na área de medicina de felinos, por me oferecer esse projeto, confiar em mim e me orientar na sua execução.

“Somos filhas e filhos da cultura onde a palavra tem muitos poderes. Com ela, narramos o mundo que vemos e vivemos. Expomos as atrocidades. Mas, através dela, somos vozes orquestradas para mudança. Aprender e ensinar são motores de luta.”

Jurema Werneck

RESUMO

A panleucopenia felina é uma doença infectocontagiosa, causada por um parvovírus (Protoparvovírus dos carnívoros 1). Acomete tanto gatos domésticos quanto felídeos selvagens, em todas as idades, sendo mais prevalente em gatos jovens, imunossuprimidos e/ou com protocolo de vacinação incompleto. A taxa de mortalidade em gatos infectados pode chegar a 90%, e o diagnóstico precoce para um tratamento intensivo e isolamento, reduz significativamente as chances de óbito e transmissão viral. O teste mais confiável para o diagnóstico de infecção pelo parvovírus felino (FPV) é a PCR (reação em cadeia da polimerase), porém testes rápidos facilitam e agilizam o diagnóstico na rotina dos atendimentos veterinários. Esse trabalho teve como objetivo verificar o grau de concordância entre um teste rápido baseado em imunocromatografia e a PCR para diagnosticar a infecção pelo FPV em gatos com manifestação clínica de diarreia ou fezes pastosas (escore fecal 5 a 7). Para isso, foi utilizado um teste rápido imunocromatográfico comercial validado para a detecção de antígeno do parvovírus canino (CPV-2). O FPV apresenta similaridade genômica (98%) com o CPV-2, fazendo com que o mesmo teste seja utilizado em gatos, embora sua utilização em felinos ainda não tenha sido validada pelo fabricante. Foram coletadas amostras com suabe retal de 44 gatos. Dessas, duas amostras (4,65%) foram positivas para o FPV, e 42 (95,35%) foram negativas. Os resultados foram concordantes em ambos os testes, tanto das amostras positivas, quanto negativas.

Palavras-chave: FPV, panleucopenia, imunocromatografia, PCR.

ABSTRACT

Feline panleukopenia is an infectious disease caused by a parvovirus (Carnivore protoparvovirus 1). It affects both domestic and wild cats of all ages, but is more prevalent in young, immunosuppressed cats and/or cats with incomplete vaccination protocols. The mortality rate in infected cats can reach 90%, and early diagnosis for intensive treatment and isolation significantly reduces the chances of death and viral transmission. The most reliable test for diagnosis of feline parvovirus (FPV) infection is PCR (Polymerase Chain Reaction), but rapid tests facilitate and expedite the diagnosis in routine veterinary care. This study aimed to verify the degree of agreement between a rapid test based on immunochromatography and PCR to diagnose FPV infection in cats with clinical manifestations of diarrhea or pasty feces (fecal score 5 to 7). For this, a validated commercial rapid test for detection of canine parvovirus antigen (CPV-2) was used. FPV shows genomic similarity (98%) to CPV-2, making the same test usable in cats, although its use in felines has not yet been validated by the manufacturer. Rectal swabs were collected from 44 cats. Of these, two samples (4,65%) were positive for FPV, and 42 (95,35%) were negative. The results were concordant in both positive and negative samples.

Keywords: *FPV, panleukopenia, immunochromatography, PCR.*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Histórico da taxonomia do vírus da panleucopenia felina (FPV).....	12
Figura 2 -	Estrutura do parvovírus felino.....	13
Figura 3 -	Ciclo replicativo dos parvovírus.....	15
Figura 4 -	Porcentagem de gatos filhotes com doenças virais separados por idade e por agente viral.....	17
Figura 5 -	Patogenia da panleucopenia felina.....	19
Figura 6 -	Teste rápido de imunocromatografia.....	24
Figura 7 -	Escores de condição fecal incluídos no estudo.....	26
Figura 8 -	Procedimento do teste de imunocromatografia.....	28
Figura 9 -	Amostra positiva para FPV no teste de imunocromatografia.....	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Soroprevalência para FPV em populações de gatos adultos não vacinados ou com histórico de vacinação desconhecido.....	18
Tabela 2 -	Sinais clínicos relatados em 24 felinos diagnosticados com panleucopenia felina no Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.....	20
Tabela 3 -	Resultados dos testes de imunocromatografia e PCR Convencional de acordo com a faixa etária e origem dos gatos testados.....	30
Tabela 4 -	Suspeitas clínicas dos gatos com manifestação de diarreia que passaram por atendimento veterinário.....	32

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
2.1	Vírus da Panleucopenia Felina.....	12
2.1.1	Taxonomia e estrutura viral.....	12
2.1.2	Evolução e similaridade entre o parvovírus canino e felino.....	13
2.1.3	Replicação viral.....	14
2.2	Panleucopenia Felina.....	15
2.2.1	Epidemiologia.....	16
2.2.2	Transmissão e patogenia.....	18
2.2.3	Sinais clínicos.....	19
2.2.4	Diagnóstico.....	21
2.2.5	Controle e profilaxia.....	21
2.3	Imunocromatografia.....	23
2.4	PCR Convencional.....	24
3	OBJETIVO.....	25
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
4.1	Amostras.....	26
4.1.1	Critérios de inclusão.....	26
4.1.2	Coletas das amostras.....	27
4.2	Imunocromatografia.....	28
4.3	PCR Convencional.....	28
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
6	CONCLUSÃO.....	34
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35
	ANEXO A - Termo de consentimento livre e esclarecido.....	40

1 INTRODUÇÃO

A panleucopenia felina é uma doença infectocontagiosa distribuída mundialmente, e acomete os felídeos domésticos e selvagens, além de outras espécies, como visons e guaxinins (MORAES *et al*, 2017) e é caracterizada por causar sintomas gastroentéricos, como diarreia e vômito, e linfopenia. Em gatos, a doença pode ser causada tanto pelo vírus da panleucopenia felina (FPV) quanto por variantes do parvovírus canino (CPV-2a, CPV-2b e CPV-2c) (HUEFFER *et al*, 2003; BARR, 2019). O que possibilita essa infecção interespecífica é a homologia da sequência do DNA entre os dois vírus (FPV e CPV-2), que atinge 98% de identidade (MOCHIZUKI, 1996). Os sinais clínicos da doença são inespecíficos, fazendo com que a investigação da causa ainda seja um desafio na rotina clínica, podendo, muitas vezes, não se chegar a um diagnóstico definitivo. Estudos já mostraram que condutas terapêuticas intensivas e adequadas reduzem significativamente as taxas de mortalidade de gatos infectados pelo FPV (TRUYEN *et al*, 2015). Assim, o diagnóstico precoce da doença se faz essencial no prognóstico dos pacientes. Outra justificativa para que seja realizado o diagnóstico da doença é que gatos infectados devem ser isolados para que seja evitada a contaminação de possíveis contactantes, e assim evitar a doença em outros felinos.

A reação da polimerase em cadeia – PCR (do inglês *Polymerase Chain Reaction*) de amostras fecais ou suabe retal é uma modalidade de teste sensível para parvovírus e tem sido usado como padrão ouro (de referência) para avaliar outros métodos de diagnóstico (AWAD, *et al* 2018; FAZ *et al*, 2017). Contudo, é um exame que costuma ter um custo mais elevado em relação a outros testes e o resultado pode demorar até três dias devido a sua maior complexidade de execução (JACOBSON, 2021). A PCR também é realizada somente em laboratórios com equipamentos apropriados. Os testes mais rápidos e de fácil execução, como a imunocromatografia, são preferíveis aos veterinários, tutores e responsáveis por abrigos de animais, tanto pelo custo quanto por não necessitarem de insumos e equipamentos específicos. Na falta de um teste específico para felinos, o teste rápido que detecta antígenos virais do parvovírus canino (CPV-2) em amostras fecais é utilizado para detectar o FPV em gatos, porém a testagem do parvovírus felino não é validada pelos fabricantes (JACOBSON, 2021). Os objetivos deste trabalho foram comparar os resultados de um teste rápido para CPV-2 com o teste de PCR convencional em amostras de suabe retal de gatos com manifestação de diarreia.

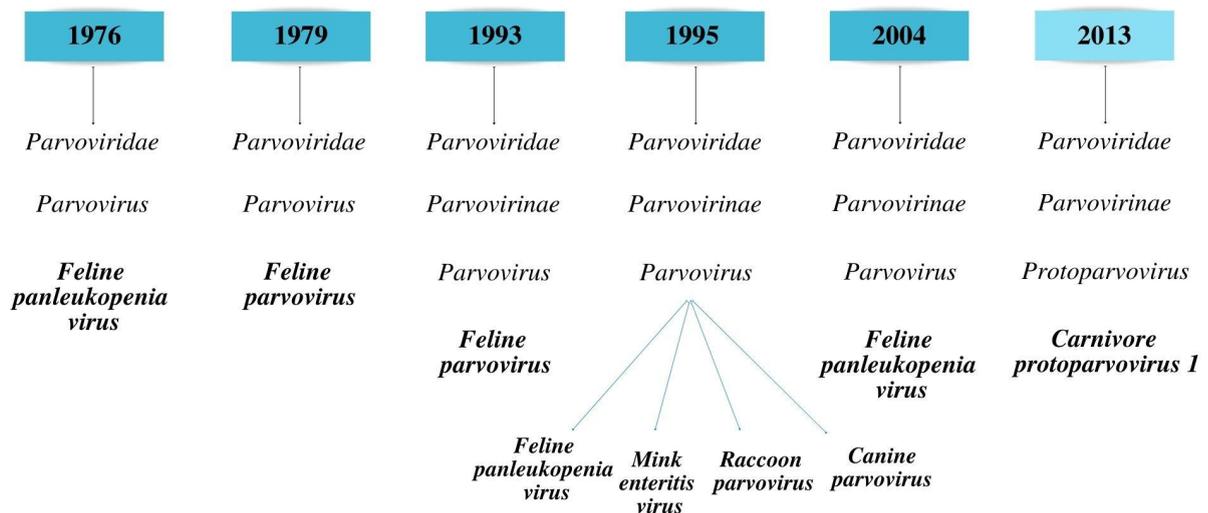
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Vírus da Panleucopenia Felina

2.1.1 Taxonomia e estrutura viral

O vírus da panleucopenia felina (FPV - *Feline Panleukopenia Virus*) é membro da família *Parvoviridae*, subfamília *Parvovirinae*, gênero *Protoparvovirus* (ICTV, 2019). O gênero *Protoparvovirus* engloba os agentes associados com doenças em animais (MORAES *et al*, 2017). Devido a semelhança genômica e capacidade de infecção interespecífica, o Comitê Internacional de Taxonomia Viral (ICTV - *International Committee on Taxonomy of Viruses*) propôs em 2013 que o grupo do FPV, que inclui o parvovírus canino (CPV-2 - *Canine Parvovirus type 2*), o vírus da enterite da marta (MEV - *Mink Enteritis Virus*) e o parvovírus do guaxinim (RaPV - *Raccoon parvovirus*), constitui-se, na verdade, em uma espécie viral, o Protoparvovírus dos carnívoros 1 (*Carnivore protoparvovirus 1*) (Figura 1), e que os vírus individuais seriam subespécies (MORAES *et al*, 2017).

Figura 1 - Histórico da taxonomia do vírus da panleucopenia felina (FPV)



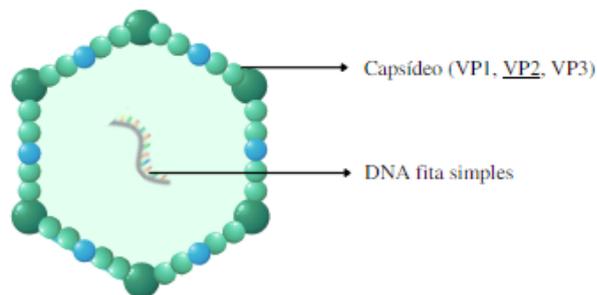
Fonte: a própria autora, adaptado de ICTV (*International Committee of Taxonomy on Viruses*) (2019)

Os parvovírus são pequenos, com genomas de DNA de fita simples (ssDNA) lineares e não envelopados. Os genomas dos parvovírus de importância veterinária possuem apenas duas fases de leitura abertas (ORFs - *Open Reading Frames*) que codificam quatro proteínas:

duas proteínas não estruturais (NS1 e NS2) e duas ou três proteínas estruturais (VP1 e VP2/VP3). Além disso, o genoma viral apresenta de 6 a 10 sequências palindrômicas, que possibilitam a formação de estruturas em forma de grampo nas regiões terminais. Essas estruturas são essenciais para a replicação do genoma viral e para a encapsidação do genoma na progênie viral (MORAES *et al*, 2017).

A estrutura do FPV é formada por três proteínas: VP1, VP2 e VP3 (Figura 2). O capsídeo é responsável pela interação dos vírions com os receptores da célula hospedeira, e é formado principalmente por VP2. Conseqüentemente, é na VP2 que se encontram os epítomos que induzem a formação de anticorpos neutralizantes. Uma pequena mudança nessa proteína pode determinar alteração de tropismo por células e hospedeiros (MORAES *et al*, 2017). Os genes que codificam a VP2 são utilizados para detecção dos parvovírus, pois esses genes são pouco conservados, mas os detectam de forma seletiva.

Figura 2 - Estrutura do parvovírus felino



Fonte: a própria autora (2022)

2.1.2 Evolução e similaridade entre o parvovírus canino e felino

Durante muito tempo se acreditou que a ampla utilização de vacinas atenuadas do FPV para a prevenção da panleucopenia felina possibilitou uma mutação no genoma do FPV que teria dado origem ao parvovírus canino (TRATSCHIN *et al*, 1982). Entretanto, as teorias mais aceitas atualmente, colocam que o CPV-2 não tenha surgido diretamente do FPV, mas de um parvovírus ancestral muito semelhante ao FPV, ou que tenha surgido a partir de um parvovírus comum entre carnívoros (CARMICHAEL, 2005).

O FPV e o CPV-2 são dois vírus intimamente relacionados, com uma similaridade genômica de aproximadamente 98% e diferem em cerca de 6-7 aminoácidos na proteína de capsídeo VP2 (DOMINGUES, 2018; PARRISH, 1994; 1999). Os gatos podem ser infectados tanto pelo FPV, quanto por variantes do CPV-2. O parvovírus felino causa 95% dos casos de

panleucopenia felina, enquanto 5% são causados por variantes do parvovírus canino, especificamente CPV-2a, b e c, sendo que as variantes também podem causar doença em gatos (BARR, 2019).

2.1.3 Replicação viral

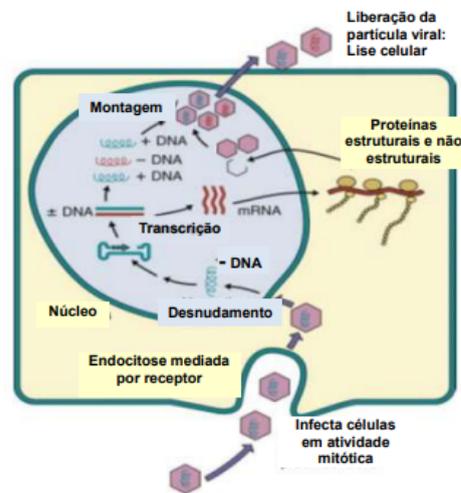
O parvovírus felino é um vírus autônomo e se replica no núcleo das células hospedeiras em divisão mitótica ativa, sendo elas as células epiteliais intestinais, linfóides, da medula óssea e embrionárias. A sua replicação depende de fatores celulares que estão presentes somente quando a célula está em fase S ou G2 (MORAES *et al*, 2017).

A determinação do tropismo celular ou tecidual do vírus depende de sequências específicas de aminoácidos na superfície dos vírions, importantes para o reconhecimento e ligação aos receptores celulares (MORAES *et al*, 2017). No CPV e no FPV, o tropismo é determinado por três aminoácidos da VP2. Substituições de aminoácidos no gene VP2 foram responsáveis por propriedades genéticas e antigênicas adquiridas durante a evolução do parvovírus (PARRISH & CARMICHAEL, 1983).

O receptor utilizado pelo FPV e o CPV-2 para reconhecimento da célula-alvo é o receptor de transferrina (TfR), que é expresso principalmente em células em divisão mitótica, dependentes de transferrina para se multiplicarem. A transferrina é uma glicoproteína responsável pelo transporte de ferro para dentro da célula. Após a ligação destes vírus ao receptor TfR ocorre a formação de um complexo (vírus-receptor) que é rapidamente transportado para o interior da célula (DOMINGUES, 2018) (Figura 3). A penetração ocorre por via endocítica, e os vírions são transportados rapidamente até as proximidades do núcleo celular. Durante esse trajeto, as partículas virais são expostas a pH progressivamente mais baixos no interior do endossomo, o que induz alterações na conformação das proteínas do capsídeo. No interior dos endossomos, as partículas virais sofrem três alterações importantes: exposição da região amino-terminal da VP1, clivagem da região amino-terminal da VP2 e, finalmente, desnudamento do genoma (MORAES *et al*, 2017).

A idade de um animal infectado é muito importante para o estabelecimento dos principais alvos da infecção pelo parvovírus, sendo os tecidos fetais ou de recém-nascidos uma rica fonte de células em atividade mitótica. Em animais jovens o tecido linfóide e particularmente o epitélio do intestino delgado apresentam intensa proliferação celular (STEINEL *et al*, 2001).

Figura 3 - Ciclo replicativo dos parvovírus



Fonte: DOMINGUES (2018) *apud* MORAES *et al* (2017)

2.2 Panleucopenia Felina

A panleucopenia felina é uma doença infectocontagiosa importante de felinos domésticos e selvagens, podendo levar à extinção de populações inteiras de gatos susceptíveis. Os animais mais afetados são gatos com menos de um ano de idade, podendo contaminar também adultos não vacinados ou com o protocolo de vacinação incompleto, e gatos que convivem aglomerados com outros felinos. A infecção ocorre principalmente por contato com ambientes contaminados com o vírus através de secreções, como fezes e vômitos (GREENE *et al*, 2006). Também pode ocorrer transmissão intrauterina, provocando abortos, natimortos, mumificação fetal e hipoplasia cerebelar em filhotes (GREENE *et al*, 2008). Durante a manifestação clínica da doença, o animal infectado pode apresentar sinais como diarreia, vômitos, anorexia, prostração, desidratação, hipotermia, fezes pastosas, mucosas pálidas, convulsões, ataxia cerebelar (CASTRO *et al*, 2014). Esses sinais clínicos dependem do tipo de células mitóticas infectadas, uma vez que o vírus tem tropismo por essas células. Em exames hematológicos é possível identificar linfopenia, neutropenia, seguida de trombocitopenia e anemia, além de imunossupressão transitória em gatos adultos (TRUYEN *et al*, 2015).

O genoma do FPV é detectado através de PCR em sangue total ou fezes. Para detecção de antígeno viral são utilizados teste de aglutinação em látex ou testes de imunocromatografia, porém esses testes não são utilizados rotineiramente, ou ainda, não são disponibilizados no Brasil.

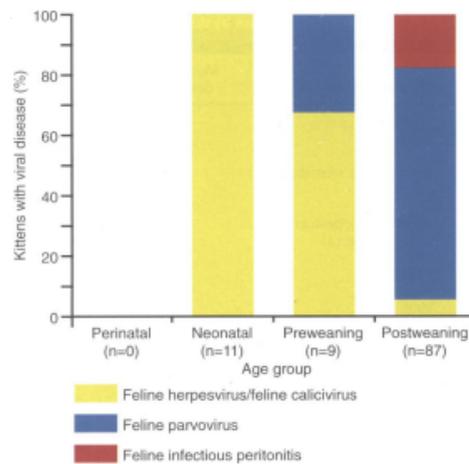
A vacinação é o melhor método de prevenção contra a doença. Vacinas com vírus atenuado e inativado estão disponíveis no mercado e a vacinação contra o agente está incluída no protocolo de vacinas essenciais. Filhotes ou animais com maior risco de contaminação, como gatos de abrigos, devem receber a vacina com o vírus atenuado (TRUYEN *et al*, 2015).

2.2.1 Epidemiologia

A panleucopenia felina é uma doença cosmopolita que ocorre em todos os membros da família *Felidae* e em algumas espécies das famílias *Mustelidae*, *Procyonidae*, *Viverridae* e *Canidae* (STUETZER, 2014). Sua incidência varia de acordo com a virulência do agente e com a proporção de indivíduos suscetíveis na população de felinos (COSTA, 2020). Há uma tendência sazonal para a ocorrência da doença, com aumento no número de casos no final do verão e início do outono (BARRS, 2019).

As taxas de mortalidade e morbidade mais altas são observadas com maior frequência em filhotes menores de um ano de idade (TRUYEN *et al*, 2015) e oriundos de regiões próximas a grupos de gatos não vacinados ou nascidos de mães não vacinadas, atingindo taxa de mortalidade de 90% nesses animais (ZORAN, 2006). Mesmo quando realizado tratamento intensivo, a taxa de mortalidade é alta, variando entre 50 e 80% (BARRS, 2019). Embora poucos dados em relação à prevalência da panleucopenia felina estejam disponíveis, gatis de criação e abrigos de resgate são os locais com maior risco de contaminação viral (TRUYEN *et al*, 2015). Em um estudo retrospectivo que avaliou a principal causa de morte de felinos com até 16 semanas de idade, as doenças virais levaram ao maior número de óbitos, sendo que dessas, a panleucopenia felina foi a principal doença (CAVE *et al*, 2002). O parvovírus foi detectado em 25% dos filhotes (Figura 4), o que surpreendeu os autores, já que se acreditava que a vacinação contra o FPV estava estabelecida e aceita na região onde ocorreu o estudo (CAVE *et al*, 2002).

Figura 4 - Porcentagem de gatos filhotes com doenças virais separados por idade e por agente viral



Fonte: CAVE *et al* (2002)

A probabilidade de um gato não vacinado desenvolver imunidade ao FPV por exposição ao vírus aumenta com a idade (DIGANGI *et al*, 2012). Em geral, a soroprevalência entre gatos adultos varia amplamente entre as diferentes populações de gatos não vacinados (Tabela 1). Um estudo (NEWBURY, 2006), revelou que 48% dos gatos admitidos em um abrigo de animais de Wisconsin (Estados Unidos) tinham anticorpos contra o FPV. Esses dados mostram que apesar da vacinação disponível, a incidência da infecção pelo parvovírus felino ainda é bastante relevante nos países onde esses estudos foram realizados, mesmo em gatos adultos. A sorologia de gatos domésticos não vacinados em outros países revelou uma soroprevalência para FPV com variação de 8% a 96%, embora <50% dos gatos fossem soropositivos em 7 de 10 estudos (JENKINS, 2020).

Tabela 1 - Soroprevalência para FPV em populações de gatos adultos não vacinados ou com histórico de vacinação desconhecido

Ano da amostragem	País	Origem dos gatos	Nº de gatos testados	Soroprevalência do FPV (%)	Referência
2017-2018	Itália	Gatos errantes	151	46	DALL'ARA <i>et al</i> , 2019
2013	Rússia	Gatos de tutores	60	45	PAVLOVA <i>et al</i> , 2015
2011-2012	Alemanha	Gatos de tutores	28*	29	MENDE <i>et al</i> , 2014
2010	Estados Unidos	Gatos recém adquiridos em abrigos	111	55	DIGANGI <i>et al</i> , 2012
2007	França	Gatos de tutores e errantes	469*	25	HELLARD <i>et al</i> , 2011
2005	Estados Unidos	Gatos errantes	61*	33	FISCHER <i>et al</i> , 2007
2001	Guatemala	Gatos de tutores	24	38	LICKEY <i>et al</i> , 2005
1998-2001	Costa Rica	Gatos de tutores	52*	93	BLANCO <i>et al</i> , 2009
1998-2000	Arábia Saudita	Gatos de rua	10	10	OSTROWSKI <i>et al</i> , 2003

*Alguns gatos menores de um ano de idade foram incluídos nesses estudos.
Fonte: a própria autora, adaptado de BARRS (2019)

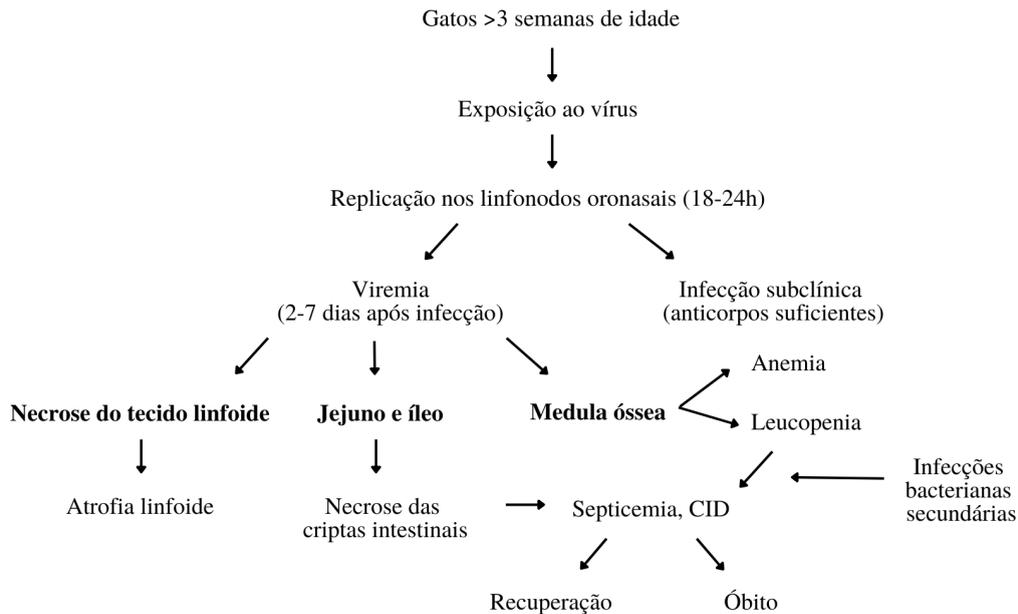
2.2.2 Transmissão e Patogenia

O FPV causa uma infecção sistêmica, sendo transmitido principalmente por via fecal-oral (TRUYEN *et al*, 2015); porém, também pode ocorrer através do contato com vômito, saliva ou, urina ou fômites contaminados com o vírus, como vasilhas de ração e água, caixas sanitárias, sapatos e roupas (GREENE, 2012; BARRS, 2019; SYKES, 2014). O vírus replica inicialmente nos tecidos da orofaringe e, em seguida, é distribuído pela corrente sanguínea (viremia) para praticamente todos os tecidos do corpo (TRUYEN *et al*, 2015).

Por possuir tropismo por células com alta taxa mitótica, o vírus causa destruição de células como enterócitos, células mieloides (todas as linhagens) e tecidos linfoides, causando grave enterite necrótica, pancitopenia e necrose de tecidos linfoides (GELBERG, 2013; TRUYEN *et al*, 2015). A destruição das células da cripta intestinal leva à injúria das vilosidades intestinais, causando também má absorção e aumento de permeabilidade

(STUETZER, 2014). A infecção viral nos linfócitos pode causar imunossupressão. A linfopenia pode surgir como resultado da lise dos linfócitos ou atrofia tímica. A Figura 5 ilustra a patogenia do parvovírus felino em gatos livres de patógenos específicos (SPF - *Specific Pathogen Free*), e maiores do que três semanas de idade.

Figura 5. Patogenia da panleucopenia felina



Fonte: Adaptado de GREENE (1998)

Em fêmeas gestantes, pode ocorrer transmissão intrauterina, uma vez que as células embrionárias também possuem alta atividade mitótica (GREENE *et al*, 2006). As consequências da infecção durante a gestação podem ser observadas durante esse mesmo período, em virtude de abortos, ou durante as primeiras semanas de vida, através de sinais clínicos observados nos filhotes, como panleucopenia e sinais relacionados à hipoplasia cerebelar, também descritos no tópico 2.2.3.

2.2.3 Sinais clínicos

A infecção por FPV e CPV-2 pode ser clínica ou subclínica (BARRS, 2019). Os principais sinais clínicos relatados são vômito, diarreia, anorexia, apatia e hipotermia (Tabela 2) e febre, com subsequente panleucopenia (CASTRO *et al*, 2014; COSTA, 2020). Os sinais gastroentéricos podem não ser evidentes no início ou envolver apenas vômitos (KENNEDY,

2012). Outros sinais como desidratação, fezes pastosas, mucosas pálidas, convulsões e icterícia também foram descritos em um estudo envolvendo a análise do histórico clínico de 24 gatos com panleucopenia felina (CASTRO *et al*, 2014). A frequência de cada sinal clínico observada nesse estudo está descrita na Tabela 2. Ao contrário da enterite por CPV-2 de cães, a diarreia hemorrágica ocorre em apenas 3% a 15% dos casos de panleucopenia felina (BARRS, 2019). Devido à depleção de células mielóides, pode ocorrer também coagulação intravascular disseminada (CID), com manifestação clínica de petéquias e hemorragias, embora gatos normalmente não mostrem sinais de hemorragia, mesmo com acentuada trombocitopenia (GREENE, 2012). Também pode ser observado espessamento das alças intestinais e dor ou desconforto na palpação abdominal, bem como aumento de linfonodos mesentéricos e ulceração na cavidade oral (GREENE, 2012).

Tabela 2 - Sinais clínicos relatados em 24 felinos diagnosticados com panleucopenia felina no Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Sinais clínicos	Nº de casos	%
Vômito	12	50,00
Diarreia	10	41,67
Anorexia	8	33,33
Prostração	7	29,17
Desidratação	5	20,83
Hipotermia	4	16,67
Fezes pastosas	3	12,5
Mucosas pálidas	3	12,5
Convulsão	3	12,5
Icterícia	3	12,5

Fonte: Adaptado de CASTRO *et al* (2014)

As gatas infectadas ou que receberam vacina com vírus atenuado durante os estágios iniciais da prenhez podem apresentar infertilidade ou aborto de fetos mortos ou mumificados; porém, não demonstram outros sinais clínicos (STUETZER, 2014; GREENE, 2012). Alguns filhotes da ninhada podem desenvolver sinais cerebelares, devido à hipoplasia cerebelar, quando a mãe é infectada ou vacinada com vírus atenuado nos estágios finais da prenhez ou quando são infectados na primeira semana de vida (SHARP, 1999). Os sinais cerebelares incluem ataxia, hipermetria e tremores de cabeça que começam a ser observados entre duas a três semanas de vida, e não são progressivos.

A frequência com que os gatos mostram sinais clínicos de panleucopenia é muito menor do que o número de gatos infectados por esse vírus (GREENE, 2012). Essa informação é comprovada pela alta prevalência de anticorpos na população de gatos não vacinados, mesmo em países onde a vacinação já é bem disseminada, conforme descrito na Tabela 1.

2.2.4 Diagnóstico

O diagnóstico presuntivo de panleucopenia felina é dado pelo histórico, presença de sinais clínicos compatíveis e leucopenia (GREENE, 2012). Amostras de fezes ou suabe retal são os mais recomendados para realização dos testes laboratoriais, porém outras amostras também podem ser utilizadas, como vômito e sangue total. O vômito não é validado para os testes disponíveis, porém um estudo demonstrou que o FPV pode ser detectado nesse tipo de amostra quando utilizado o teste de imunocromatografia (JACOBSON, 2021).

O diagnóstico laboratorial pode ser realizado pela detecção do FPV a partir do isolamento em células permissíveis ou detecção de antígeno e genoma virais. Os testes utilizados são o isolamento viral em culturas de células de rim de gato (*Crandell Feline Kidney Cells*– CRFK), reação de hemaglutinação (HA), testes rápidos baseados no ensaio imunoenzimático ou imunocromatográfico e detecção do genoma viral por PCR e/ou PCR em tempo real (qPCR) (APPEL; PARRISH, 1987; GOTO, 1975; MIYAZAWA *et al*, 1999; JACOBSON, 2021). Os testes imunológicos baseados na detecção de anticorpos de FPV, tais como o ensaio imunoenzimático (ELISA indireto) e a imunofluorescência indireta, são considerados de valor diagnóstico limitado, pois não diferenciam entre infecção e anticorpos induzidos pela vacinação (TRUYEN *et al*, 2015).

2.2.5 Controle e profilaxia

O controle da panleucopenia felina é realizado principalmente através da vacinação, que é bastante eficaz em prevenir a doença (SCHERK, 2013). Estão disponíveis no mercado vacinas com o vírus atenuado e inativado. Se não houver interferência de anticorpos maternos, a imunidade protetiva é desenvolvida uma semana depois de uma dose de vacina atenuada (JAS, 2009) que dura por, pelo menos, três anos (DAY, 2020) e, possivelmente, para o resto da vida (GORE, 2006). Mesmo a vacina inativada tem mostrado proteção contra um desafio por até 7,5 anos (SCOTT, 1999). É importante destacar que não é recomendada a vacinação parenteral ou intranasal com o FPV atenuado em gatos com menos de quatro semanas de

idade, devido ao risco de desenvolvimento de hipoplasia cerebelar ou manifestação de sinais clínicos da panleucopenia felina. Caso seja necessária a vacinação antes desse período, é recomendado que seja utilizada a vacina com o vírus inativado (SCHERK, 2013). Em gatos acima de quatro semanas de idade que convivam aglomerados em abrigos ou gatis de criação é recomendada a vacinação com vírus atenuado, devido à uma resposta imunológica mais eficiente (DAY, 2020). Embora existam produtos licenciados com FPV inativado para o uso em gatas prenhes, em geral, essas gatas não devem ser vacinadas segundo as bulas das vacinas disponíveis no Brasil (COSTA, 2020). Em gatos infectados por FeLV e FIV, e nos gatos imunocomprometidos, recomenda-se utilizar uma vacina com vírus morto em vez de vacina com vírus vivo modificado (KENNEDY, 2012).

Alguns gatos não respondem adequadamente à vacinação, isso se aplica não somente ao parvovírus (BERGMANN, 2018), mas a qualquer vacina, tanto em animais, quanto em humanos. Vários fatores podem ser responsáveis pela ausência de resposta à vacinação. Em humanos, doenças crônicas, como diabetes e doença renal crônica, são descritos como responsáveis pela produção insuficiente de anticorpos (YU, 2006). Outras razões para uma resposta inadequada à vacinação incluem variações genéticas ou um sistema imunológico que não reconhece o antígeno vacinal (BERGMANN, 2018). A administração incorreta ou armazenamento sob condições inadequadas de temperatura da vacina, levando à desnaturação da proteína do antígeno, também podem fazer com que não haja uma resposta imune, ou que essa seja inadequada. Como a proteção induzida pela vacina é variável e não absoluta, a vacinação não deve ser utilizada como única forma de proteção (STONE, 2020).

O manejo ambiental adequado também deve ser considerado como forma de controlar e prevenir a infecção pelo vírus. Os filhotes de gatos suscetíveis e os adultos não vacinados não devem ficar em contato com outros gatos, e tampouco com cães com parvovirose, até que sejam propriamente imunizados (COSTA, 2020). Gatos que apresentem sinais clínicos de FPV, comprovados por evidência laboratorial, devem ser mantidos em isolamento com cuidados de barreira estritos para prevenir a transmissão por fômites (TRUYEN *et al*, 2015). Além disso, a desinfecção do ambiente deve ser feita com produtos com composições eficazes contra o vírus.

Outra forma de imunização é através da transferência passiva de anticorpos. Deve ser realizada antes do aparecimento dos sinais clínicos e pode ser usada para proteger, de forma rápida, os filhotes com um histórico de vacinação incompleto, filhotes que não ingeriram colostro e adultos não vacinados (STUETZER, 2014). O soro anti-FPV pode ser obtido pela coleta de sangue de doadores saudáveis e testados para doenças infecciosas (FeLV, vírus da

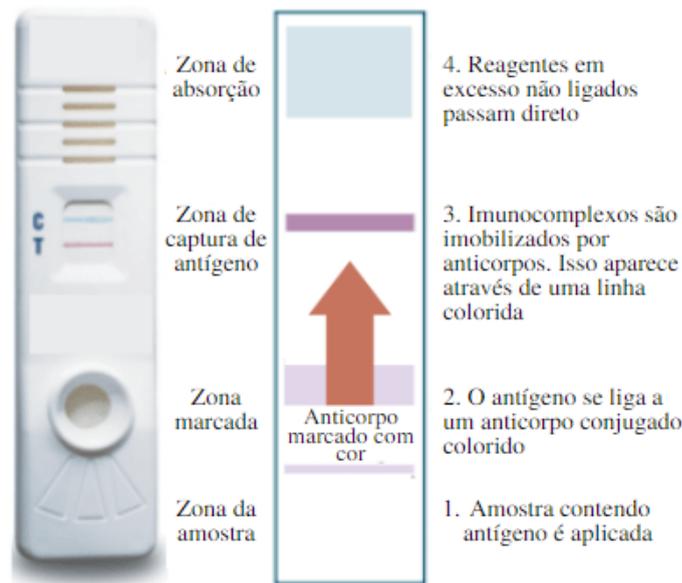
imunodeficiência felina e *Mycoplasma haemofelis*), seguida da separação e preparação do soro, que pode ser congelado a -20°C durante 1 ano após a coleta (LEVY, 2001).

No ambiente, o parvovírus é altamente persistente, e também resistente a grande parte dos processos de desinfecção (ZORAN, 2006), podendo permanecer viável de três meses até um ano, sendo mais resistentes em matéria orgânica do que nas demais superfícies. São estáveis à temperatura de 56°C por 60 minutos e a pH variando entre 3 e 9 (MORAES *et al.*, 2017). O vírus pode ser inativado por produtos contendo formaldeído, hipoclorito sódico, hidróxido de sódio e ácido peracético (TRUYEN *et al.*, 2015).

2.3 Imunocromatografia

A imunocromatografia é um teste de imunoenensaio qualitativo, que pode ser utilizado para detecção de antígeno ou anticorpos contra o agente a ser pesquisado. Entre as vantagens de execução desse teste, encontram-se a rapidez e a facilidade de execução e de leitura do resultado, que fazem com que seja cada vez mais empregado. Esse teste é utilizado comumente para detecção de antígenos, como do vírus da leucemia felina (FeLV), parvovírus canino (CPV) e morbilivírus canino (CDV), e detecção de anticorpos contra o vírus da imunodeficiência felina (FIV). Uma amostra biológica contendo o antígeno (no caso deste estudo, a amostra fecal diluída em solução tampão) é aplicada em uma membrana porosa. Por ação capilar, essa solução desliza lateralmente por esta membrana porosa, passando por uma zona onde encontra anticorpos imobilizados que se ligam a uma proteína viral específica de um agente, ocorrendo a formação de complexos imunes (TIZARD, 2014). Este anticorpo pode ser marcado com ouro coloidal (cor rosa) ou selênio coloidal (cor azul). Assim, uma reação é positiva quanto a formação dessa interação, entre antígeno e anticorpo, é mostrada pelo aparecimento de uma banda rosa ou azul, dependendo do teste. Ainda, uma banda de controle positivo é mostrada, provando a eficácia do teste (esquema ilustrado na Figura 6). Esses testes também podem ser empregados para detecção de anticorpos usando antígenos ligados ao substrato (TIZARD, 2014).

Figura 6 - Teste rápido de imunocromatografia



Fonte: Adaptado de TIZARD (2014)

2.4 PCR Convencional

A PCR, que significa reação em cadeia da polimerase (do inglês *Polymerase Chain Reaction*), é uma técnica que tem como princípio a replicação do DNA. A PCR Convencional é um método qualitativo para detecção de sequências nucleotídicas em amostras, através da amplificação de um fragmento específico de DNA. A especificidade da reação é determinada pelas sequências iniciadoras complementares (também denominadas *primers*).

A reação será composta pela amostra (fonte de DNA), os *primers*, desoxirribonucleotídeos e uma DNA-polimerase termo resistente, no tampão adequado. Através da variação cíclica de temperaturas realizada por um termociclador, ocorre a desnaturação das fitas complementares de DNA, o pareamento dos *primers* com suas regiões específicas de cada fita e a replicação dos fragmentos pela enzima DNA-polimerase. Após realizar um determinado número de ciclos, obtêm-se milhares de cópias da sequência de interesse. Os produtos de PCR gerados são submetidos à eletroforese com gel de agarose e visualizados em luz ultravioleta para determinar se a amostra é positiva quanto à presença do DNA a ser detectado (MOSENA *et al*, 2019). Na detecção de microrganismos, a sequência genômica será o alvo da PCR.

3 OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi comparar os resultados de um teste comercial de imunocromatografia para detecção do CPV-2 (Alere® - Parvovirose Test Kit), com a PCR convencional, a fim de detectar o vírus da panleucopenia felina em amostras de suabe retal de gatos com manifestação clínica de diarreia. Desta maneira, procurou-se avaliar se o teste imunocromatográfico é eficaz na detecção do FPV, podendo otimizar o diagnóstico da panleucopenia felina.

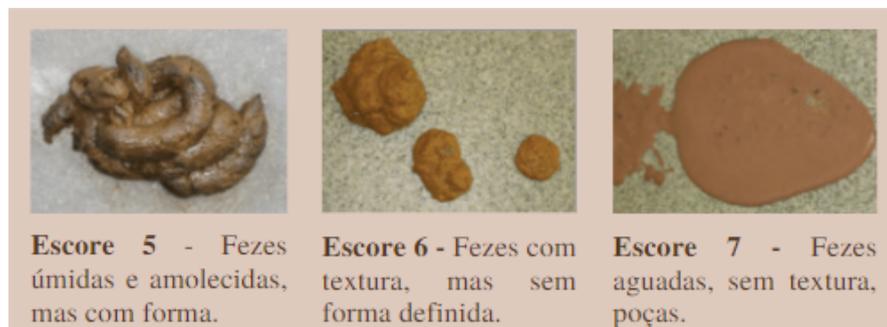
4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Amostras

4.1.1 Critérios de inclusão

Alguns critérios foram estabelecidos para identificar gatos com sinais clínicos suspeitos de infecção por FPV. Assim, foram incluídos no estudo gatos com manifestação clínica de diarreia ou fezes pastosas (escore fecal 5 a 7 de acordo com o *Purina Fecal Scoring System* da Nestlé Purina® *PetCare Company*, Figura 7), com ou sem o quadro de panleucopenia em exames de sangue, podendo ou não ter outros sinais clínicos como vômito, anorexia, desidratação, hipotermia e piroxia associados com a diarreia ou as fezes pastosas. Também foi incluído um gato sem nenhuma manifestação clínica e sem exames de sangue para avaliação. Este último gato foi incluído porque tratava-se de um filhote que teve contato com outros gatos que estavam manifestando sinais clínicos compatíveis com panleucopenia felina. O histórico de vacinação também foi considerado, já que o teste de imunocromatografia utilizado pode ter um resultado falso-positivo por até três semanas após a imunização com vacinas atenuadas (NEUERER, 2008). Assim, os gatos que haviam sido vacinados em um período ≤ 3 semanas antes da data do teste foram excluídos do estudo. Os gatos errantes que haviam sido resgatados recentemente, sobre os quais não havia informação sobre o histórico, foi presumido que não haviam sido vacinados.

Figura 7 - Escores de condição fecal incluídos no estudo



Fonte: Adaptado de *Purina Fecal Scoring System* da Nestlé Purina® *PetCare Company* (2007)

Durante a coleta de dados, também foi questionada a suspeita clínica sobre os gatos que passaram por atendimento veterinário, que foi definida pelo veterinário que estava realizando o atendimento. Também foram coletados dados referentes à idade e raça dos felinos.

4.1.2 Coletas das amostras

Para a realização das coletas, houve a aprovação prévia pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA, UFRGS), com o número 40706. A liberação para uso das dependências do Hospital de Clínicas Veterinárias da UFRGS também foi solicitada e aprovada, mediante a documentação exigida. Todas as coletas foram realizadas com autorização dos tutores e dos diretores das clínicas e abrigos particulares, conforme Anexo A.

As amostras foram coletadas no período de agosto de 2021 a abril de 2022. As análises foram realizadas na cidade de Porto Alegre e as amostras coletadas foram oriundas das cidades de Porto Alegre, Viamão e Canoas, todas localizadas no estado do Rio Grande do Sul. As amostras eram provenientes de diferentes locais, sendo uma clínica veterinária particular, dois abrigos particulares, à domicílio e no Hospital de Clínicas Veterinárias (HCV) da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (FAVET/UFRGS). Sendo assim, a origem dos animais foram as mais diversas, desde gatos domiciliados, até gatos que viviam em colônias.

A coleta do material fecal foi realizada com suabe retal, que foi escolhido pelo fato de ser possível coletar uma amostra sem que o gato precisasse ter defecado no momento da coleta, já que o teste precisa ser realizado com as fezes frescas ou mantida sob refrigeração (2 a 8°C) por, no máximo, 48 horas. Esse tipo de coleta e armazenagem são opções determinadas pelo fabricante do teste utilizado. Com o gato posicionado em estação ou decúbito lateral, foi realizada a coleta de material com a inserção do suabe à uma medida de 1-2 centímetros intrarretal até que estivesse com conteúdo fecal presente na haste. Durante todo o processo de coletas foi realizado um manejo amigável, na tentativa de proporcionar baixo nível de estresse, medo ou desconforto para os gatos (RODAN *et al*, 2011).

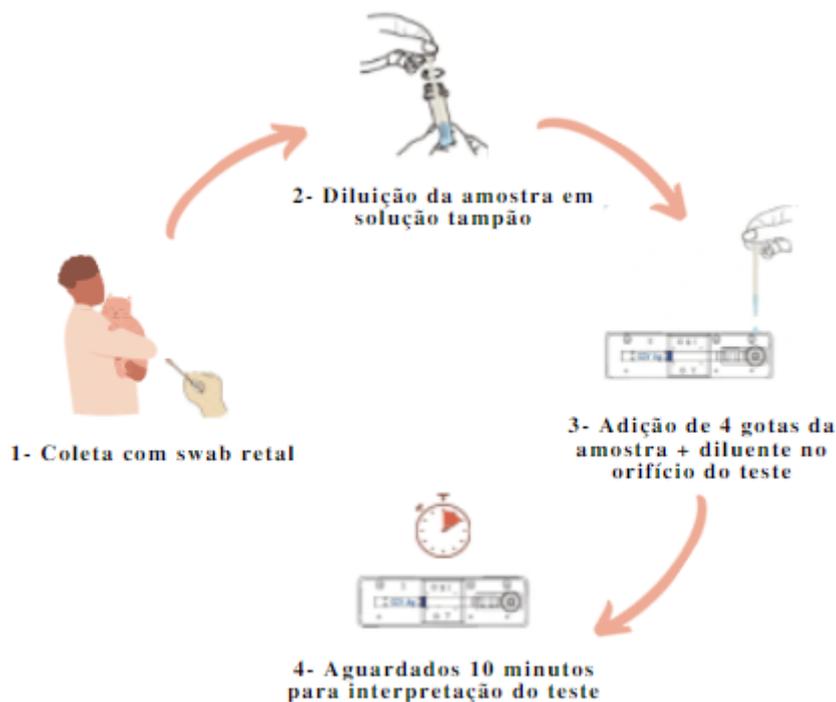
Foram coletados dois suabes retais: o primeiro para o teste de imunocromatografia e um segundo para a PCR Convencional. A segunda amostra foi coletada e imediatamente suspensa em 400 microlitros (μL) de diluente PBS 1x pH 7,4 e armazenada a -20°C em um tubo Eppendorf para posterior análise molecular.

4.2 Imunocromatografia

O teste imunocromatográfico foi executado imediatamente após a coleta de suabe retal, seguindo os protocolos do fabricante (Alere® - Parvovirose Test Kit). O resultado desse teste é lido em 5-10 minutos, devendo ser desconsiderado o resultado após 20 minutos.

O teste de imunocromatografia foi realizado no momento da coleta, seguindo o protocolo do fabricante do teste rápido (Figura 8).

Figura 8 - Procedimento do teste de imunocromatografia



Fonte: Adaptado de GENEMEDI (2018)

4.3 PCR Convencional

A PCR Convencional foi realizada em até 48h após a coleta de amostras, no Laboratório de Virologia Veterinária da FAVET/UFRGS. A extração do DNA viral das amostras, assim como do controle positivo, foi feita através do protocolo Fenol-Clorofórmio (SAMBROOK, 2006). Foi amplificado um fragmento de 583 pb do gene VP2 usando os *primers* CPV555for e CPV555rev com temperatura de anelamento de 50°C (BUONAVOGLIA, *et al*, 2001). Os *primers* utilizados para a amplificação do fragmento do

FPV é o mesmo utilizado para detecção do CPV-2, uma vez que ambos amplificam a mesma sequência de nucleotídeos codificadora da proteína do capsídeo viral. Foi utilizado como controle positivo uma vacina quádrupla felina comercial (Felocell® CVR), com o vírus atenuado, diluída na proporção 1:10 μL (1 μL da vacina para cada 10 μL de água ultrapura). Um estudo demonstrou que a sequência genômica do FPV de gatos infectados apresenta identidade de 98,4% a 99,0% (DOMINGUES, 2018) com a sequência da mesma vacina utilizada para o controle positivo neste trabalho. Como controle negativo foi utilizada água ultrapura.

Os produtos de PCR gerados foram submetidos à eletroforese com gel de agarose com concentração de 1% (determinada a partir do tamanho do fragmento esperado) e visualizados em luz ultravioleta (MOSENA *et al*, 2019).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante o período de estudo, foram analisadas e processadas 44 amostras de gatos com diarreia ou fezes pastosas. Do total de amostras, duas foram positivas (4,65%) para infecção pelo FPV, tanto no teste de imunocromatografia, quanto na PCR. Todas as amostras negativas também tiveram resultados compatíveis entre os dois testes (95,35%). Dos animais positivos, um era filhote (dois meses) e o outro tinha quatro anos de idade, apesar de gatos filhotes (até um ano de idade) serem mais susceptíveis à infecção por FPV (VOGT, 2010)

Em relação às faixas etárias, houve uma variação de gatos testados com dois meses até 13 anos de idade, sendo que houve um maior número de felinos com diarreia/fezes pastosas com idade acima de um ano ($n = 26$). Como trata-se de uma doença que acomete principalmente filhotes (TRUYEN *et al*, 2015), é possível que se houvesse um maior número de gatos menores de um ano de idade testados, o número de amostras positivas seria maior. A origem dos animais, de acordo com as respectivas faixas etárias e resultado dos testes utilizados, estão descritos na Tabela 3.

De acordo com a origem dos gatos, foi coletado um maior número de amostras em abrigos de animais (Tabela 3). Além disso, apenas dois animais possuíam raça definida: um Maine Coon e um Persa. Ambos foram negativos para infecção por FPV, embora gatos com raça definida possam maiores chances de infecção pelo vírus (ADDIE *et al*, 1998).

Tabela 3 - Resultados dos testes de imunocromatografia e PCR Convencional de acordo com a faixa etária e origem dos gatos testados

Origem	≤ 1 ano de idade (n)	> 1 ano de idade (n)	Total por origem (n)
Abrigos	8*	9	17
HCV/UFRGS	4	10*	14
Clínica particular	3	5	8
Coleta domiciliar	3	2	5
Total por idade (n)	18	26	-

*Um gato positivo

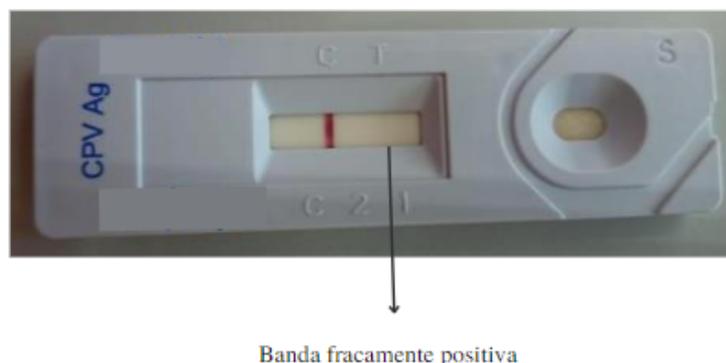
Fonte: a própria autora (2022)

Das amostras positivas, uma era proveniente do HCV/UFRGS, e o diagnóstico de panleucopenia foi definido quando analisadas as lesões da necropsia e teste de imunohistoquímica. Esse gato, apresentava sinais de vômito, convulsão, leucopenia e

neutrófilos tóxicos no leucograma, além de trombocitopenia e hematócrito de 53% (referência 24 a 45%, para felinos). A outra amostra positiva foi coletada de um felino que havia sido resgatado de uma colônia de gatos e estava sob tutela de um abrigo de animais. O mesmo não apresentava sinais clínicos (saudável) e foi incluído casualmente no estudo devido ao histórico de contato com outros dois gatos que estavam com manifestação clínica de diarreia e anorexia, mas não haviam sido testados. Esse mesmo gato também não apresentou nenhum sinal clínico posterior à coleta da amostra, ou seja, teve infecção assintomática.

Nos dois testes positivos, a linha do teste se demonstrou fracamente positiva (Figura 9). Esses resultados foram considerados positivos, pois nos casos de cães com sinais clínicos de enterite parvoviral, o fabricante recomenda interpretar uma leve mudança de cor como sendo uma amostra positiva, porém ainda não se sabe se esta recomendação deve ser aplicada a amostras de gatos. Ademais, o resultado do teste foi confirmado através da PCR convencional, onde pôde-se observar uma banda fracamente positiva, assim como foi observado no teste rápido. Esses resultados podem indicar a presença de baixa carga viral nas amostras em questão, já que o controle positivo do FPV estava com coloração mais intensa do que as mesmas na visualização do gel de agarose. Na tentativa de compreender os motivos desse resultado, foram encontrados dados que indicam que a baixa carga viral das amostras positivas pode estar associada ao fato de que o vírus só pode ser detectado nas fezes durante o período de 24 a 48 horas de infecção e, no momento que existem sinais clínicos, o vírus pode não ser mais identificado pelo teste (GREENE, 2012). Esses dados tendem a mudar as diretrizes do estudo, já que gatos podem ter cargas virais maiores antes da manifestação de sinais clínicos como a diarreia.

Figura 9. Amostra positiva para FPV no teste de imunocromatografia



Fonte: a própria autora (2022)

Não se pode descartar as chances de haver resultados falso-negativos em ambos os testes, nas amostras onde não houve a detecção viral. Uma quantidade muito baixa de vírus presente nas amostras, ou a presença de variantes do FPV poderiam justificar esses resultados em ambos os testes realizados neste estudo. Como opção, em relação a PCR, poderiam ser utilizados outros *primers*. Um estudo norte-americano já avaliou os resultados do teste de imunocromatografia para diagnóstico de infecção por FPV, porém o teste era proveniente de outro fabricante e o resultado foi comparado com uma técnica de diagnóstico molecular quantitativo (qPCR) (JACOBSON, 2021). O teste quantitativo mostrou que o teste de imunocromatografia teve alta especificidade, mas baixa sensibilidade. A suspeita foi de que a baixa sensibilidade estaria ligada a baixa carga viral presente nas amostras, mas as amostras que tiveram uma banda fraca no teste rápido se mostraram positivas na qPCR. O autor também destaca que resultados negativos em animais clinicamente afetados não são confiáveis e devem ser sempre confirmados por PCR (JACOBSON, 2021). Além disso, por ser uma técnica que permite resultados quantitativos que podem ser acompanhados em tempo real, a qPCR tem maior nível de e especificidade em relação à PCR convencional, e por isso também é mais indicada para o diagnóstico de FPV.

Em relação às suspeitas clínicas, foi observada maior prevalência de diarreia não esclarecida (quando não se sabia a causa até o momento da coleta de amostra) e verminose (Tabela 4). Os gatos que não foram incluídos na Tabela 4 (n = 17) não haviam passado por atendimento veterinário, sendo assim, não tinham uma suspeita clínica definida, e todos eles eram originários de abrigos.

Tabela 4 - Suspeitas clínicas dos gatos com manifestação de diarreia que passaram por atendimento veterinário

Suspeita clínica	%
Diarreia não esclarecida	7 (13,95%)
Verminose	7 (13,95%)
DII/Linfoma	4 (9,30%)
Panleucopenia*	3 (6,97%)
Anemia grave (FeLV +)	2 (4,65%)
Doença renal crônica	2 (4,65%)
Gastroenterite por antibioticoterapia	1 (2,32%)

*Um resultado positivo

Fonte: a própria autora (2022)

Um obstáculo encontrado para realização deste estudo foi a falta de interesse por parte de veterinários e tutores em realizar a testagem dos gatos com diarreia. Em conversas com os mesmos sobre o presente projeto de pesquisa, pôde-se observar que muitos acreditam que trata-se de uma doença que acomete somente filhotes e que mesmo assim, não é emergente devido à existência de uma vacina eficaz. Não foram encontrados dados referentes à prevalência de gatos que foram imunizados contra o vírus da panleucopenia felina. Porém, alguns dados mostram que na região sul do Brasil, uma média de 49% dos cães e gatos possuem vacinação contra o vírus da raiva (IBGE, 2019; DOMINGUES, 2015). Esses dados indicam que o acesso à vacinação ainda é baixo, podendo se refletir quando se fala em vacinação contra outros agentes, como o FPV. Além disso, a panleucopenia é uma doença reemergente nos gatos de abrigos, se disseminando também para gatos domiciliados (BARRS, 2019). Ademais, mesmo em países onde a vacinação é bem distribuída, a soroprevalência em gatos que não foram vacinados é alta (conforme a Tabela 1), quando comparado com outras enfermidades. Estes fatos mostram que é necessária uma atenção maior no diagnóstico de gatos com sintomatologia clínica compatível com a panleucopenia felina e também em gatos com infecção assintomática em áreas de risco.

6 CONCLUSÃO

A comparação dos resultados do teste comercial de imunocromatografia para detecção do CPV-2 (Alere® - Parvovirose Test Kit) com a PCR Convencional, mostrou que o teste rápido é capaz de detectar o vírus da panleucopenia felina nas amostras de suabe retal. Assim, até o momento, pode-se afirmar que houve compatibilidade entre os dois testes utilizados. Contudo, é necessário que haja um estudo com maior número de amostras avaliadas para que se possa confirmar o nível de sensibilidade e especificidade do teste quando utilizado em gatos.

As ferramentas aqui empregadas poderiam ser incorporadas ao arsenal de métodos que estão se tornando indispensáveis aos laboratórios de pesquisa microbiológica e clínica. A aquisição de experiência com os métodos empregados representa uma contribuição significativa, envolvendo laboratórios e setores de vocações diferentes e associando conhecimentos de virologia, epidemiologia e clínica. Além disso, os resultados obtidos serão divulgados em eventos científicos e serão enviados em forma de artigo para serem publicados em periódico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADDIE, D. D. *et al.* **Detection of feline parvovirus in dying pedigree kittens.** *Vet Rec*; v. 142: p. 353–56. 1998.
- APPEL, M.; PARRISH, C.R. Canine parvovirus type 2: *In: Virus infection of carnivores.* Amsterdam: Elsevier Science Publisher Brazilian Veterinary, Cap. 7. p.69-92, 1987.
- AWAD, R. A. *et al.* **Epidemiology and diagnosis of feline panleukopenia virus in Egypt: clinical and molecular diagnosis in cats.** *Vet World*, 2018; v. 11: p. 578–584.
- BARRS, V. R. **Feline panleukopenia: a re-emergent disease.** *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2019, v. 49(4): p. 651–70. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2019.02.006>.
- BERGMANN M. *et al.* **Resposta do anticorpo à vacinação do vírus da panleucopenia felina em gatos adultos saudáveis.** *Journal of Feline Medicine and Surgery.* 2018; v. 20(12):p. 1087-1093. doi: 10.1177/1098612X17747740.
- BLANCO, K. *et al.* **Seroprevalence of viral infections in domestic cats in Costa Rica.** *J Vet Med Sci*, 2009, v. 71: 661-3.
- BUONAVOGLIA C. *et al.* Evidence for evolution of canine parvovirus type 2 in Italy. *J. Gen. Virol.* 82(12):3021-3025. 2001.
- CASTRO, N. B. *et al.* **Achados patológicos e imuno-histoquímicos em felinos domésticos com panleucopenia felina.** *Pesq. Vet. Bras.*, Rio de Janeiro, v. 34, n. 8, p. 770-775, 2014.
- CAVE T. A. *et al.* **Kitten mortality in the United Kingdom: a retrospective analysis of 274 histopathological examinations (1986 to 2000).** *Vet. Rec.*, v. 151(17): p. 497-501. 2002.
- COSTA, F. V. A., SILVEIRA, E. *et al.* Panleucopenia felina. *In: ROZA, M.R. Associação Nacional de Clínicos Veterinários de Pequenos Animais. PROMEVET Pequenos Animais: Programa de Atualização em Medicina Veterinária: Ciclo 6.* Porto Alegre: Artmed Panamericana; 2020. p. 33–61. (Sistema de Educação Continuada a Distância; v. 1).
- COTMORE *et al.* **ICTV Virus Taxonomy Profile: *Parvoviridae*.** *Journal of General Virology*, v. 100, p. 367–368. 2019.
- DALL'ARA, P. *et al.* **Prevalence of serum antibody titres against feline panleukopenia, herpesvirus and calicivirus infections in stray cats of Milan, Italy.** *Prev. Vet. Med.*, v. 167, p. 32–38, 2019.
- DAY, M. J. *et al.* **Recommendations on vaccination for Latin American small animal practitioners: a report of the WSAVA Vaccination Guidelines Group.** *Journal of Small Animal Practice.* 2020 Jun;61(6):E1-E35.
- DIGANGI, B. A. *et al.* **Prevalência de títulos de anticorpos séricos contra o vírus da panleucopenia felina, herpesvírus felino 1 e calicivírus felino em gatos que entram em um abrigo de animais da Flórida.** *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 2012, v. 241(10), p. 1320–1325. doi:10.2460/javma.241.10.1320.

DOMINGUES, L.R. **Guarda responsável de animais de estimação na área urbana do município de Pelotas, RS, Brasil.** Ciênc. saúde coletiva, v. 20, 2015. <https://doi.org/10.1590/1413-81232014201.19632013>.

FAZ, M. *et al.* **Reliability of clinical diagnosis and laboratory testing techniques currently used for identification of canine parvovirus enteritis in clinical settings.** J Vet Med Sci, 2017; v. 79: p. 213–217.

FISCHER, S.M. *et al.* **Response of feral cats to vaccination at the time of neutering.** J Am Vet Med Assoc., 2007; v. 230: 52-8.

GARCIA R. C. N. C. *et al.* **Characterization of parvoviruses from domestic cats in Brazil.** J. Vet. Diagn. Invest. v. 23(5): p.951-955. 2011.

GELBERG, H.B. Sistema digestório. *In:* McGavin M.D. & Zachary J.F. (Eds), **Bases da Patologia em Veterinária.** 5ª ed. Elsevier, Rio de Janeiro. 2013, p.323-406.

GENEMEDI. **Lateral flow assays.** Disponível em: <https://www.genemedi.net/i/diagnostic-animal-health>. Acesso em: 26 abr. 2022.

GORE, T.C. *et al.* **Three-year duration of immunity in cats following vaccination against feline rhinotracheitis virus, feline calicivirus, and feline panleukopenia virus.** Vet Ther. 2006; v. 7(3): p. 213–22.

GOTO, H. **Feline panleukopenia in Japan** - Hemagglutinability of the isolated virus. Nippon Juigaku Zasshi, v.37, p.239-245,1975.

GREENE, C.E. & Addie D.D. Feline parvovirus infections. *In:* GREENE C.E., **Doenças infecciosas do cão e do gato.** 3ª edição. Elsevier Saunders, Missouri, 2006, p.78-88.

GREENE, C. E.; Levy, J. K. Imunoprofilaxia. *In:* Greene, CE (ed). **Doenças infecciosas do cão e do gato.** 4ª edição. Elsevier Saunders, Missouri, 2012, p. 1163-1205.

HELLARD, E. *et al.* **When cats ways of life interact with their viruses: a study in 15 natural populations of owned and unowned cats (*Felis silvestris catus*).** Prev Vet Med 2011; v. 101 (3-4): 250-64.

IBGE. Pesquisa Nacional de Saúde. **Domicílios com algum cachorro ou gato em que todos os cachorros ou gatos foram vacinados contra raiva nos últimos 12 meses, por situação do domicílio.** 2019. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/4932#resultado>. Acesso em: 26/04/2022.

JACOBSON, L. S. *et al.* **Diagnostic testing for feline panleukopenia in a shelter setting: a prospective, observational study.** J Feline Med Surgery, v. 23, ed.12, p. 1192-1199. 2021.

JANKE K.J. *et al.* **Fecal viral DNA shedding following clinical panleukopenia virus infection in shelter kittens: a prospective, observational study.** Journal of Feline Medicine and Surgery. 2022, v. 24, ed. 4, p. 337-343.

JAS, D. *et al.* **Onset of immunity in kittens after vaccination with a non-adjuvanted vaccine against feline panleukopenia, feline calicivirus and feline herpesvirus.** *Vet J.* 2009 v. 182(1):p. 86–93. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2008.05.025>.

JENKINS, E. *et al.* **A soroprevalência do parvovírus felino é alta em gatos domésticos de regiões de surtos e não surtos de doenças na Austrália.** *Vírus*, v. 12,3 320. 2020. doi:10.3390/v12030320.

KENNEDY, M. Doenças infecciosas e zoonoses. *In*: LITTLE, S. E.; **O Gato - Medicina Interna.** 1ª edição. Rio de Janeiro. Editora Roca. 2012. Cap. 5. 1480-1483.

LEVY, J. K. *et al.* **Use of adult cat serum to correct failure of passive transfer in kittens.** *J Am Vet Med Assoc.* 2001 v. 219(10), p. 1401–5.

LICKEY, A. L. *et al.* **Serologic survey of domestic felids in the Peten region of Guatemala.** *J Zoo Wildl Med*, 2005, V. 36: 121-3.

MCENDAFFER L. *et al.* **Feline panleukopenia virus is not associated with myocarditis or endomyocardial restrictive cardiomyopathy in cats.** *Vet Pathol.*, 2017, v. 54(4): p. 669–75. <https://doi.org/10.1177/0300985817695516>.

MENDE, K. *et al.* **Prevalence of antibodies against feline panleukopenia virus in client-owned cats in Southern Germany.** *Vet J.* 2014; v. 199 (3): 419-23.

MIRANDA, C. *et al.* **Genetic Analysis of Feline Panleukopenia Virus Full-length VP2 Gene in Domestic Cats Between 2006–2008 and 2012–2014, Portugal.** *Transboundary and Emerging Diseases.* v. 64, p. 1178–1183. 2017.

MOCHIZUKI, M. *et al.* **Isolamento de parvovírus canino de um gato manifestando sinais clínicos de panleucopenia felina.** *Jornal de microbiologia clínica*, 1996, v. 34: 2101-5. doi:10.1128/jcm.34.9.2101-2105.1996.

MODHA S. *et al.* **ViCTree: an automated framework for taxonomic classification from protein sequences.** *Bioinformatics*, v. 34 ed. 13, 2018.

MORAES, M. P. *et al.* Parvoviridae. *In*: FLORES, E. F.; **Virologia Veterinária - Virologia Geral e Doenças Víricas.** 3ª edição. Santa Maria. Editora UFSM. 2017. Cap. 15. 450-467.

MOSENA, A. C. S. **Detection of enteric agents into a cats shelter with cases of chronic diarrhea in Southern Brazil.** *Pesq. Vet. Bras.* v 39(8): p. 630-634, 2019.

NEUERER F. F., *et al.* **Comparison of different in-house test systems to detect parvovirus in faeces of cats.** *J Feline Med Surg*, v. 10 ed. 3 :247-51, 2008.

NEWBURY, S. P. *et al.* **A high percentage of feral cats and cats entering a large shelter were found to be susceptible to feline panleukopenia virus (parvovirus) (abstr),** in *Proceedings. Conf Res Work Anim Dis*; v. 93, 2006.

NG, T. F. F. *et al.* **Feline fecal virome reveals novel and prevalent enteric viruses.** *Veterinary Microbiology*, v. 171, p. 102–111, 2014.

- OSTROWSKI, S. *et al.* **A serologic survey of wild felids from central west Saudi Arabia.** J Wildl Dis, 2003, v. 39: 696-701.
- PARRISH CR, CARMICHAEL LE. **Antigenic structure and variation of canine parvovirus type-2, feline panleukopenia virus, and mink enteritis virus.** Virology; 10:401–414, 1983.
- PAVLOVA, E. V. *et al.* **Padrões de soroprevalência de vírus felinos entre gatos domésticos (*Felis catus*) e gatos de Pallas (*Otocolobus manul*) na Reserva Daurisky, Rússia.** Revista Canadense de Zoologia . V. 93 (11): p. 849-855. <https://doi.org/10.1139/cjz-2015-0006>.
- RASOOL, N.B., *et al.* **Determination of a universal nucleic acid extraction procedure for PCR detection of gastroenteritis viruses in faecal specimens.** J Virol Methods. 2002.
- RODAN, I. *et al.* **Diretrizes de Manuseio Amigo dos Felinos da AAFP e ISFM.** Journal of Feline Medicine and Surgery. Vol 13, Ed. 5, 2011.
- SAMBROOK, J., *et al.* **Purification of nucleic acids by extraction with phenol:chloroform.** CSH Protoc. 2006.
- SCHERK M.A. *et al.* **Disease information fact sheet: feline panleukopenia.** Journal of Feline Medicine and Surgery. 2013; v. 15(Supple): p.785–808.
- SHARP, N. J. H. *et al.* **Hydranencephaly and cerebellar hypoplasia in two kittens attributed to intrauterine parvovirus infection.** J Comp Pathol. 1999, v. 121(1): p. 39–53. <https://doi.org/10.1053/jcpa.1998.0298>.
- STONE, A.E.S, *et al.* **2020 AAHA/AAFP Feline Vaccination Guidelines.** Journal of Feline Medicine and Surgery. 2020; v. 22(9):813-830. doi:10.1177/1098612X20941784.
- STUETZER, B.; HARTMANN, K. **Feline parvovirus infection and associated diseases.** The Veterinary Journal. Volume 201, Issue 2, 2014, Pgs. 150-155, ISSN 1090-0233, <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2014.05.027>.
- SYKES, J. E. **Infecção pelo vírus da panleucopenia felina e outros enterites virais.** Doenças Infeciosas Caninas e Felinas. Elsevier. Missouri. 2014;p. 187-194.
- TIZARD, I. R. **Imunologia Veterinária**, 9ª ed.,. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014. Cap. 41. 494-514.
- TOGNI, M. *et al.* **Causas de morte e razões para eutanásia em gatos na Região Central do Rio Grande do Sul (1964-2013).** Pesq. Vet. Bras. v. 38(4): p. 741-750, 2018.
- TRUYEN, U. *et al.* **Feline Panleukopenia - ABCD guidelines on prevention and management.** Journal of Feline Medicine and Surgery v. 11, p. 538-546, 2009, atualizado em 2015.
- TRUYEN, U. *et al.* **Evolution of canine parvovirus involved loss and gain of feline host range.** Virology, v. 215, p.186-189, 1996.

VOGT, A. H. *et al.* **AAFP - AAHA: Feline Life Stage Guidelines**. Journal of Feline Medicine and Surgery, v. 12, p. 43-54, 2010.

YU, A. S. *et al.* **Vacinas contra hepatitis B**. Infect Dis Clin North Am, v. 20: p. 27 – 45, 2006.

ZHANG, W. *et al.* **Faecal virome of cats in an animal shelter**. Journal of General Virology, v. 95, p. 2553–2564, 2014.

ZORAN, D.L. The cat with signs of acute vomiting. *In*: RAND, J. **Problem-based Feline Medicine**. United Kingdom: Elsevier Saunders, 2006.

ANEXO A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Eu, _____, tutor do paciente _____, da espécie felina, raça ____, do sexo ____, estou ciente de que o animal de minha propriedade estará participando do projeto de pesquisa: “**GRAU DE CONCORDÂNCIA ENTRE A IMUNOCROMATOLOGIA E A PCR PARA DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO PELO VÍRUS DA PANLEUCOPENIA FELINA (FPV)**”. A panleucopenia felina é uma doença infectocontagiosa que ocorre em gatos e, quando não tratada, pode progredir rapidamente, podendo levar à óbito. A PCR é um teste de diagnóstico molecular que é conhecido como padrão ouro para detectar a presença do vírus em amostras de fezes, suabe retal, soro ou tecidos linfóides de gatos infectados. O projeto irá comparar o resultado da PCR com o teste de imunocromatografia Alere® - Parvovirose Test Kit, já utilizado amplamente para diagnóstico de infecção pelo parvovírus em cães. Nenhum dos exames apresenta qualquer tipo de risco para o paciente. Esperamos que o estudo traga informações importantes sobre o uso de um teste mais rápido e fácil de executar na rotina clínica e contribua com a saúde individual dos participantes.

Autorizo a realização da **coleta de suabe retal**. Da mesma forma, autorizo a publicação dos dados obtidos neste projeto. No entanto, estou ciente de que posso desistir da participação do projeto a qualquer momento, sem haja qualquer prejuízo ao meu animal. Os procedimentos adotados nesta pesquisa obedecem aos princípios éticos no uso de animais, elaborados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), sobre a utilização de animais em atividades educacionais e em experimentos que envolvam espécies definidas na Lei 11.794/2008. A avaliação clínica, os testes de imunocromatografia e de PCR Convencional não terão nenhum tipo de custo.

Tendo em vista os itens acima apresentados, eu, de forma livre e esclarecida, manifesto meu consentimento em participar da pesquisa.

Assinatura do (a) tutor (a)

Assinatura da aluna (graduanda)

Assinatura da pesquisadora responsável