

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Veterinária



Dissertação

Detecção molecular de *Alphaherpesvirus felideo 1* e *Calicivirus felino* em gatos domésticos

Alice Silveira Becker

Pelotas, 2019

Alice Silveira Becker

Detecção molecular de *Alphaherpesvirus felideo 1* e *Calicivirus felino* em gatos domésticos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área de concentração: Sanidade Animal).

Orientadora: Silvia de Oliveira Hübner

Coorientadora: Francielle Liz Monteiro

Pelotas, 2019

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

B395 Becker, Alice Silveira

Detecção molecular de *Alphaherpesvirus felideo 1* e *Calicivirus felino* em gatos domésticos / Alice Silveira Becker ; Silvia de Oliveira Hübner, orientadora ; Francielle Liz Monteiro, coorientadora. — Pelotas, 2019.

42 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 2019.

1. Complexo respiratório felino. 2. CRF. 3. FeHV-1. 4. FCV. I. Hübner, Silvia de Oliveira, orient. II. Monteiro, Francielle Liz, coorient. III. Título.

CDD : 636.7

Alice Silveira Becker

Detecção molecular de *Alphaherpesvirus felideo 1* e *Calicivirus felino* em gatos domésticos

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 20/12/2019

Banca examinadora:

Profª Drª. Silvia de Oliveira Hübner (Orientadora)
Doutora em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Marcelo de Lima
Doutor em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Santa Maria

Dr. Fábio da Silva e Silva
Doutor em Ciências pela Universidade Federal de Pelotas

Profª. Drª. Paula Fonseca Finger
Doutora em Ciências pela Universidade Federal de Pelotas

Agradecimentos

Inicialmente agradeço a todos que, de alguma forma, contribuíram na minha vida pessoal e profissional, me apoiando em momentos de necessidade e comemorando os momentos de vitória. Em especial, agradeço:

À minha orientadora, professora Silvia e à minha coorientadora Dra. Francielle, por todos os ensinamentos e “puxões de orelha”;

Aos meus pais e irmão, Eli, Gui e João, pelo apoio incansável em todas as etapas de minha vida, aturando meu “bom” humor constante;

Ao Marcelinho, por aturar um pouco mais do meu “bom” humor;

À professora Marlete Cleff pelo estímulo constante ao desenvolvimento deste projeto e aos nossos felinos do ambulatório Ceval;

Aos professores Marcelo, Geferson e Gilberto, por todo aprendizado desde o meu primeiro ano no Laboratório de Virologia e nas disciplinas da graduação e pós-graduação;

À equipe sensacional do Laboratório de Virologia (sem citar nomes para evitar esquecimentos), muito obrigada por estes dois anos de convívio;

À dona Márcia pelo pãozinho caseiro e pelos cafés de todas as manhãs, e ao seu Paulo por nos garantir boas risadas;

Às minhas amigas-irmãs do Colégio São José, que me acompanham desde os sete anos de idade;

Ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária e à Universidade Federal de Pelotas, por todas as oportunidades e pela contribuição em minha formação.

***“O sucesso é a soma de pequenos
esforços repetidos dia após dia.”
Robert Collier***

Resumo

BECKER, Alice Silveira. **Detecção molecular de *Alphaherpesvirus felideo 1* e *Calicivirus felino* em gatos domésticos**. 2019. 42p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2019.

O *Alphaherpesvirus felideo 1* (FeHV-1) e o *Calicivirus felino* (FCV) são os agentes virais causadores da síndrome denominada de Complexo Respiratório Felino (CRF), patologia frequente na população de gatos domésticos, porém que carece de dados sobre a sua ocorrência no Brasil. Assim, o estudo objetivou identificar a ocorrência de FeHV-1 e FCV na região sul do Brasil, em felinos domésticos com sinais clínicos relacionados ao CRF. *Swabs* da mucosa ocular, nasal e oral/orofaríngea foram coletados de 49 gatos manifestando sinais clínicos. Destes, 82% (40/49) foram positivos para FeHV-1 na reação em cadeia da polimerase (PCR), e 41% (20/49) para o FCV na RT-PCR (via transcrição reversa). Casos de coinfeção ocorreram em 31% (15/49) dos animais. O principal sinal clínico associado ao FeHV-1 foi a secreção ocular, e ao FCV, o complexo gengivite-estomatite. O FeHV-1 foi detectado principalmente em amostras de *swabs* oculares, e o FCV em amostras de *swabs* da cavidade oral. No isolamento viral em cultivo celular foi observado efeito citopático compatível com infecção por FeHV-1 e/ou FCV em 35% (17/49) das amostras. Estes resultados demonstram a alta ocorrência de FeHV-1 e FCV em gatos sintomáticos no sul do Brasil. Em resumo, o presente trabalho apresenta contribuições para a epidemiologia do FeHV-1 e FCV.

Palavras-chave: complexo respiratório felino; CRF; FeHV-1; FCV.

Abstract

BECKER, Alice Silveira. **Molecular detection of *Felid alphaherpesvirus 1* and *Feline calicivirus* in domestic cats.** 2019. 42p. Dissertation (Master degree in Sciences) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2019.

Felid alphaherpesvirus 1 (FeHV-1) and *Felid calicivirus* (FCV) are viral agents involved in Feline Respiratory Disease Complex (FRDC), frequent disease of the domestic cat population, but with lack of data regarding its occurrence in Brazil. Thus, the study aimed to identify the occurrence of FeHV-1 and FCV in southern Brazil, in domestic cats with clinical signs related to FRDC. Sample swabs from ocular, nasal and oral/oropharyngeal mucosa were collected from 49 cats showing clinical signs. Of these, 82% (40/49) were positive for FeHV-1 in polymerase chain reaction (PCR) and 41% (20/49) for FCV in RT-PCR (reverse transcription PCR). Coinfection occurred in 31% (15/49) animals. The main clinical sign associated to FeHV-1 was the ocular discharge, and to FCV the gingivitis-stomatitis complex. FeHV-1 was detected mainly in ocular swab samples, and FCV in oral swab samples. Virus isolation in cell culture demonstrated cytopathic effect consistent with FeHV-1 and/or FCV in 35% (17/49) animals. These results demonstrate a high occurrence of FeHV-1 and FCV in symptomatic cats in southern Brazil. Briefly, the present study contributes to the epidemiology of FeHV-1 and FCV in domestic cats.

Keywords: feline respiratory disease complex; FRDC; FeHV-1; FCV.

Lista de Figuras

Introdução

| | | |
|----------|--|----|
| Figura 1 | Representação estrutural dos vírus da família <i>Herpesviridae</i> | 13 |
| Figura 2 | Representação estrutural dos vírus da família <i>Caliciviridae</i> | 14 |
| Figura 3 | Representação da organização genômica do FCV..... | 15 |

Artigo

| | | |
|----------|--|----|
| Figure 1 | Felid alphaherpesvirus-1 and feline calicivirus molecular detection according to swab collection site in 49 cats from southern Brazil. Numbers refers to the number of cats that tested positive in each site..... | 29 |
| Figure 2 | Clinical signs observed in 49 symptomatic cats evaluated. Numbers refers to the number of cats presenting each clinical sign | 30 |

Lista de Abreviaturas e Siglas

| | |
|--------|---|
| bp | <i>Base pairs</i> (pares de base) |
| cDNA | <i>Complementary DNA</i> (DNA complementar) |
| CGE | Complexo gengivite-estomatite crônica |
| CPPV-1 | <i>Carnivore protoparvovirus 1</i> (<i>Protoparvovirus carnivoros 1</i>) |
| CPE | <i>Cytopathic effect</i> (efeito citopático) |
| CRF | Complexo Respiratório Felino |
| CRFK | <i>Crandell Reese feline kidney</i> |
| DNA | <i>Deoxyribonucleic acid</i> (Ácido desoxirribonucleico) |
| ECP | Efeito citopático |
| ELISA | <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> (ensaio de imunoabsorção enzimática) |
| FCV | <i>Feline calicivirus</i> (<i>Calicivirus felino</i>) |
| FeHV-1 | <i>Felid alphaherpesvirus 1</i> (<i>Alphaherpesvirus felideo 1</i>) |
| FPLV | <i>Feline panleukopenia virus</i> (<i>Vírus da panleucopenia felina</i>) |
| g | Gramas |
| HVR | <i>Hypervariable region</i> (região hipervariável) |
| ICC | Isolamento em cultivo celular |
| IFA | Imunofluorescência |
| kbp | Kilo pares de bases |
| LAT | <i>Latency associated transcript</i> (transcrito associado à latência) |
| mg/L | Miligrama por litro |
| min | Minutos |
| mL | Mililitro |
| MEM | <i>Minimum Essential Medium</i> (meio essencial mínimo) |
| mRNA | <i>Messenger RNA</i> (RNA mensageiro) |
| Nm | Nanômetro |
| ORF | <i>Open reading frame</i> (fase aberta de leitura) |

| | |
|--------|---|
| PCR | <i>Polymerase chain reaction</i> (reação em cadeia da polimerase) |
| qPCR | <i>Quantitative PCR</i> (PCR quantitativo/tempo real) |
| RNA | <i>Ribonucleic acid</i> (Ácido ribonucleico) |
| RT-PCR | <i>Reverse transcription PCR</i> (PCR via transcrição reversa) |
| TK | <i>Thymidine kinase</i> (timidina quinase) |
| UV | <i>Ultraviolet</i> (ultravioleta) |
| U/L | Unidade por litro |
| V | Volts |
| VN | Vírus-neutralização |
| VP1 | <i>Viral Protein 1</i> (Proteína Viral 1 do capsídeo) |
| VP2 | <i>Viral Protein 2</i> (Proteína Viral 2 do capsídeo) |
| VS-FCV | <i>Virulent systemic feline calicivirus</i> (<i>Calicivirus felino virulento sistêmico</i>) |
| °C | Graus celsius |
| µL | Microlitro |
| µM | Micromolar |

Sumário

| | |
|--|-----------|
| 1 Introdução | 11 |
| 2 Revisão de Literatura | 13 |
| 2.1 Etiologia | 13 |
| 2.2 Epidemiologia | 15 |
| 2.3 Ciclo Replicativo e Patogenia | 16 |
| 2.4 Sinais Clínicos | 18 |
| 2.5 Diagnóstico | 19 |
| 2.6 Profilaxia e Controle | 21 |
| 3 Artigo - High occurrence of <i>Felid alphaherpesvirus 1</i> and <i>Feline calicivirus</i> in domestic cats from southern Brazil | 22 |
| 4 Considerações Finais | 31 |
| Referências | 32 |
| Anexo | 41 |
| ANEXO A – Aprovação da Comissão de Ética e Experimentação Animal .. | 42 |

1 Introdução

O *Alphaherpesvirus felideo 1* (*Felid alphaherpesvirus 1*, FeHV-1) e o *Calicivirus felino* (*Feline calicivirus*, FCV) são os agentes virais mais comuns em enfermidades do trato respiratório superior de felinos. Compõem a síndrome denominada de Complexo Respiratório Felino (CRF), caracterizada por sinais clínicos de trato respiratório superior, como espirros, secreção nasal e tosse, sinais oculares como conjuntivite, secreção ocular e úlceras de córnea, e lesões orais como presença de vesículas e úlceras na língua. O CRF também é associado a agentes bacterianos, como *Bordetella bronchiseptica* e *Chlamidophyla felis*, que podem infectar os animais de forma secundária aos agentes virais, ou causar a enfermidade até mesmo de forma primária (COHN, 2011; SYKES, 2014).

O FeHV-1 possui a capacidade de estabelecer latência em seus hospedeiros, tornando os animais infectados portadores deste vírus. Períodos de imunossupressão podem levar a reativação viral, e retorno dos sinais clínicos, predispondo os animais a infecção por agentes secundários (THIRY et al., 2009). O FCV por sua vez, é capaz de replicar em determinados tecidos por longos períodos, sem causar sinais clínicos, tornando este animal uma potente fonte de infecção para outros animais suscetíveis. Além disso, devido as características genéticas, o FCV sofre frequentes mutações, fator que dificulta a formulação de vacinas que previnam a infecção frente a todas as cepas circulantes (RADFORD et al., 2009; WILLI et al., 2016).

O FeHV-1 e FCV possuem distribuição mundial, afetando felinos domésticos e selvagens. Possuem altas taxas de morbidade, principalmente em locais de alta densidade populacional, como abrigos e gatis. As taxas de mortalidade tendem a ser baixas, porém podem ser elevadas quando a enfermidade acomete animais recém-nascidos ou filhotes (COHN, 2011; SYKES, 2014). No Brasil, existem relatos de detecção de FeHV-1 e FCV em animais domésticos e selvagens (FILONI et al., 2012; RUTHNER BATISTA et al., 2012; FURTADO et al., 2017; LARA et al., 2017). Dados de ocorrência destes vírus na população de gatos domésticos são descritos no estado do Rio de Janeiro (CASTRO et al., 2015; PEREIRA et al., 2018), e nas regiões central, metropolitana e sudeste do Rio Grande do Sul, provenientes de um estudo conduzido

entre 2006 e 2009 (HENZEL et al., 2012a) e de um estudo sorológico no mesmo Estado (HENZEL et al., 2013). Assim, ainda são escassos os estudos sobre a ocorrência destes agentes no Sul do país, principalmente na região sul do Estado.

O diagnóstico de FeHV-1 e FCV baseia-se na detecção dos agentes de forma direta, principalmente por isolamento em cultivo de células (ICC), e pela identificação do material genético viral através de técnicas moleculares, como reação em cadeia da polimerase (PCR) e reação em cadeia da polimerase via transcrição reversa (RT-PCR). Métodos sorológicos também podem ser utilizados, contudo não diferenciam animais infectados naturalmente de animais vacinados (RADFORD et al., 2009; THIRY et al., 2009). Na prática, o diagnóstico é geralmente realizado somente pelos sinais clínicos característicos do CRF, sem a identificação dos agentes envolvidos (COHN, 2011; SYKES, 2014), fator que influencia até mesmo na disponibilidade de dados de ocorrência em cada região.

O presente estudo descreve a ocorrência de FeHV-1 e FCV em gatos domésticos sintomáticos no município de Pelotas (Rio Grande do Sul, Brasil). Assim, a dissertação é composta pelo estudo sob a forma de artigo científico:

- High occurrence of *Felid alphaherpesvirus 1* and *Feline calicivirus* in domestic cats from southern Brazil.

2 Revisão de Literatura

2.1 Etiologia

O *Alphaherpesvirus felideo 1* (*Felid alphaherpesvirus 1*, FeHV-1) pertence à família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae* e gênero *Varicellovirus* (ICTV, 2018). Possui genoma DNA de fita dupla com cerca de 135 kpb (kilo pares de bases) (GASKELL et al., 2007; SHELDON TAI et al., 2010), envolvido por um capsídeo icosaédrico e mais externamente, por uma camada proteica amorfa denominada de tegumento. As partículas virais possuem um envelope lipoproteico, e diâmetro de 178 nm (nanômetros) (MCGEOCH et al., 2006) (Figura 1). A enfermidade causada pelo FeHV-1 é denominada de Rinotraqueite Viral Felina, e quando associada ao FCV é comumente descrita como Complexo Respiratório Felino (CRF) (THIRY et al., 2009).

Devido a sua capacidade altamente contagiosa, o nome atribuído à família remete a palavra grega “*herpein*”, que significa “rastejar”. De maneira geral, os herpesvírus são caracterizados por permanecer em latência em seus hospedeiros, após a infecção inicial, tornando os animais portadores por toda a vida. A latência do FeHV-1 ocorre em neurônios do gânglio trigêmio, e em determinados períodos de estresse ou imunossupressão, o vírus retorna ao seu sítio primário de replicação, causando o reaparecimento dos sinais clínicos e excreção viral (STILES, 2003).

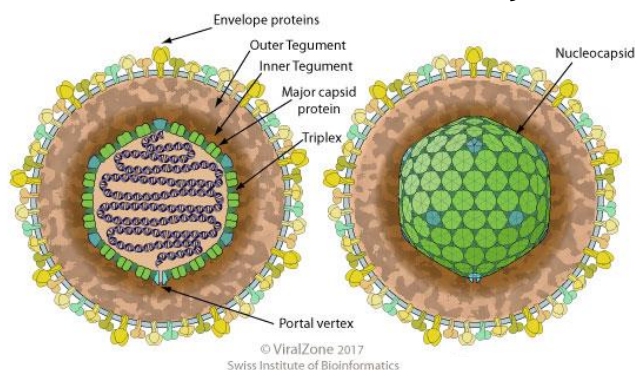


Figura 1. Representação estrutural dos vírus da família *Herpesviridae*. Fonte: © ViralZone (<https://viralzone.expasy.org/>).

O *Calicivirus felino* (*Feline calicivírus*, FCV) pertence à família *Caliciviridae* e gênero *Vesivirus* (ICTV, 2018). São vírions pequenos, que possuem um capsídeo icosaédrico com cerca de 35 a 40 nm, e são desprovidos de envelope (Figura 2). O nome dado a esta família provém do latim “*calix*”, devido à morfologia externa do vírus, caracterizada por depressões similares a estrutura de um cálice (THIEL & KÖNIG, 1999; BHELLA et al., 2008).

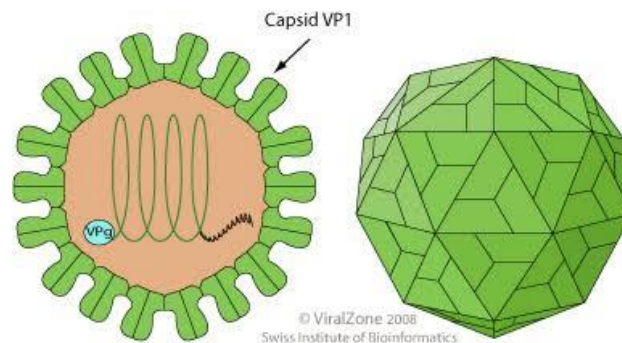


Figura 2. Representação estrutural dos vírus da família *Caliciviridae*. Fonte: © ViralZone (<https://viralzone.expasy.org/>).

O FCV possui genoma RNA de fita simples de polaridade positiva, com 7,7 kbp, dividida em três fases abertas de leitura (*Open Reading Frame*, ORF). A ORF1 é responsável por codificar proteínas não-estruturais, a ORF2 codifica a principal proteína do capsídeo (*Viral Protein 1*, VP1), e a ORF3 codifica uma proteína menor do capsídeo (VP2) (RADFORD et al., 2007; PESAVENTO et al., 2008). Assim como outros vírus de genoma RNA, o FCV sofre mutações frequentes, devido à ausência da capacidade de correção de erros da RNA polimerase. Ademais, recombinações entre diferentes cepas podem ocorrer durante a infecção e replicação em um mesmo hospedeiro, fator que contribui para a alta variabilidade genética identificada neste vírus (PESAVENTO et al., 2008).

A ORF2 do FCV é subdividida em seis regiões distintas, identificadas de A a F (Figura 3). Enquanto algumas são mais conservadas, como as regiões A, B, D e F, as regiões C e E são bastante variáveis entre diferentes isolados. A região E possui uma região conservada (conE) que separa as duas regiões hipervariáveis (5' e 3' *hypervariable region*, HVR), e onde se localizam as regiões imunodominantes que servem de alvo para anticorpos neutralizantes (RADFORD et al., 2003).

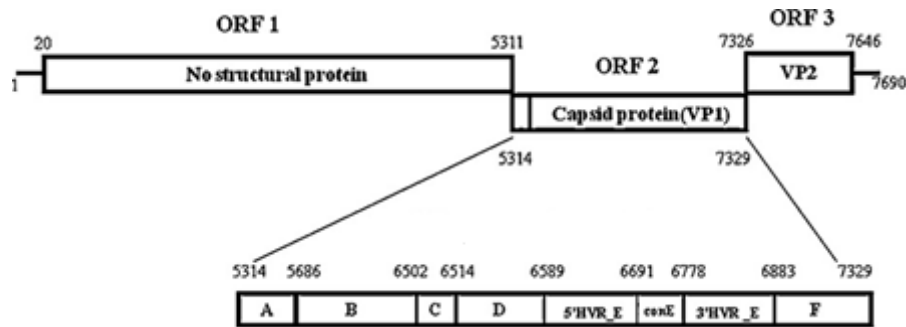


Figura 3. Representação da organização genômica do FCV. Adaptado de Henzel et al. (2012b).

2.2 Epidemiologia

O FeHV-1 e FCV apresentam distribuição mundial, e são causa frequente de enfermidade respiratória na população de felinos domésticos. A morbidade está diretamente relacionada ao número de animais presentes em um mesmo ambiente, sendo mais frequente em locais de alta densidade populacional, como gatis, abrigos e colônias de gatos (COHN, 2011). As taxas de mortalidade geralmente são baixas, entretanto, o acometimento de animais recém-nascidos e filhotes, assim como surtos de Calicivirose Sistêmica, contribuem para o aumento destes números (HURLEY et al., 2004; SYKES et al., 2014).

No Brasil, dados de detecção sorológica e isolamento viral do FeHV-1 e FCV em animais domésticos são descritos no Rio Grande do Sul (JOHANN et al., 2009; HENZEL et al., 2012a; HENZEL et al., 2013) e no Rio de Janeiro (CASTRO et al., 2015; PEREIRA et al., 2018). Além disso, estudos em animais selvagens detectaram os vírus tanto por métodos sorológicos, como moleculares (FILONI et al., 2006; FILONI et al., 2012; RUTHNER BATISTA et al., 2015; FURTADO et al., 2017; LARA et al., 2017).

A transmissão ocorre através do contato direto entre animais infectados e suscetíveis, com eliminação viral em secreções oculares, orais e nasais (RADFORD et al., 2009; THIRY et al., 2009). Com relação a contaminação ambiental, o FeHV-1 possui menor resistência quando comparado ao FCV, pois mesmo em condições ideais de umidade, persiste por cerca de 18 horas no ambiente (FRANCO et al., 2017). Devido à presença do envelope em sua estrutura externa, é facilmente degradado com detergentes comuns. Entretanto, a capacidade de latência dos herpesvírus torna

o animal infectado um portador permanente, sendo uma fonte de transmissão quando ocorre reativação e re-excreção viral (THIRY et al., 2009).

A contaminação ambiental e infecção via fômites é mais preocupante em relação ao FCV, devido a sua maior resistência a desinfetantes comuns, podendo permanecer no ambiente por até trinta dias. Além disso, a existência de animais carreadores assintomáticos, que têm replicação ativa do vírus em tecidos orofaríngeos, sem causar sinais clínicos, torna mais dificultoso o seu controle. Estes animais podem manter a replicação viral ativa por períodos que variam de meses até anos (RADFORD et al., 2009).

2.3 Ciclo replicativo e patogenia

O FeHV-1 replica inicialmente em epitélios da mucosa conjuntival, corneal, nasal e orofaríngea. O ciclo replicativo se dá pela transcrição e expressão de três genes: *alfa* (ou de transcrição imediata), *beta* (ou iniciais) e *gama* (tardios). Os genes *alfa* são transcritos e traduzidos assim que o genoma viral penetra no núcleo da célula, originando as proteínas essenciais para que os genes *beta* sejam transcritos e traduzidos. Após a expressão dos genes *beta*, inicia-se a replicação do genoma e simultânea expressão dos genes *gama*, que darão origem as proteínas estruturais, necessárias para a montagem das novas partículas virais (FRANCO et al., 2017).

Para que o ciclo replicativo dos herpesvírus se complete e progênie viral seja produzida, sempre ocorrerá a lise celular, pois os mecanismos envolvidos neste processo não são compatíveis com a sobrevivência da célula hospedeira. Dessa forma, a replicação inicial causa inflamação e necrose tecidual (FRANCO et al., 2017). Em geral não ocorre viremia, pois a replicação deste agente se restringe a tecidos de baixas temperaturas. Entretanto, em neonatos ou animais hipotérmicos, esta viremia pode ocorrer. Os sinais clínicos surgem cerca de três a cinco dias após a infecção inicial, e a enfermidade tem curso de duas a três semanas (SYKES, 2014).

Posteriormente a replicação inicial e manifestação clínica, denominada de ciclo lítico, inicia-se a fase conhecida como ciclo latente. O vírus invade os axônios de neurônios sensoriais regionais e migra até o gânglio neuronal, no caso do FeHV-1, o gânglio trigêmeo. No corpo neuronal, o genoma do vírus permanece na forma epissomal e mantém-se em latência, ou seja, sem ocorrer replicação e produção de progênie viral, por períodos indeterminados. Dessa forma, sinais clínicos associados

à replicação viral também não irão ocorrer (STILES, 2003; MAGGS, 2005; FRANCO et al., 2017).

O mecanismo associado à latência dos herpesvírus ainda é alvo de constantes estudos. Neste ciclo, caracterizado pela ausência de replicação ou expressão gênica, ocorre a inibição dos genes alfa, os primeiros genes a serem transcritos e traduzidos durante o ciclo lítico. Entretanto, um único transcrito foi identificado, denominado de transcrito associado à latência (*latency associated transcript*, LAT), e que parece ter função direta na inibição da replicação. Em ciclos líticos, onde ocorre a replicação e produção de progênie viral, o LAT tem sua transcrição reduzida (FRANCO et al., 2017). Sugere-se ainda que células da córnea também possam ser um sítio de latência do FeHV-1 em alguns animais, visto que já foi detectado nesta região em animais clinicamente saudáveis (STILES & POGRANICHNIY, 2008; STILES, 2014).

Uma vez infectado pelo FeHV-1, o animal torna-se portador do vírus por toda a sua vida. Em momentos de estresse ou durante o uso de corticosteroides, fatores que levam à imunossupressão, pode ocorrer reativação viral. O vírus retorna ao seu sítio primário de replicação, o que geralmente é acompanhado do reaparecimento dos sinais clínicos e excreção viral (GASKELL et al., 2007).

A replicação do FCV, por sua vez, se dá após a infecção inicial, principalmente em tecidos epiteliais da orofaringe, com a formação de vesículas e úlceras no epitélio da cavidade oral, além de necrose e infiltração neutrofílica (RADFORD et al., 2007; NEILL & BAUERMANN, 2017). Após a penetração na célula hospedeira, a ORF1 é imediatamente traduzida, dando origem a uma poliproteína precursora que é clivada em proteínas envolvidas no processo replicativo. As ORF2 e ORF3 são traduzidas a partir de mRNAs (RNAs mensageiros) subgenômicos, originando as proteínas do capsídeo, VP1 e VP2 (PESAVENTO et al., 2008; NEILL & BAUERMANN, 2017). Diferentes cepas podem ser identificadas simultaneamente em um animal, devido a mutações que ocorrem durante o processo replicativo do vírus, característica comum aos vírus que possuem genoma RNA, tanto por mutações, quanto por recombinações entre cepas (SYKES, 2014).

Uma viremia transitória ocorre por cerca de três a quatro dias após a infecção inicial, seguida da manifestação da enfermidade aguda e consequente aparecimento dos sinais clínicos. A doença possui um curso de duas a três semanas, e os animais acometidos geralmente têm uma recuperação completa da doença, com total eliminação do agente em um período de 30 dias (RADFORD et al., 2009). Há ainda

cepas que podem apresentar maior tropismo pelo epitélio pulmonar, causando enfermidade em trato respiratório inferior, caracterizada por uma pneumonia exsudativa que progride para uma pneumonia intersticial proliferativa, muitas vezes fatal em filhotes (RADFORD et al., 2007); e cepas que afetam articulações, causando quadros de sinovite aguda (PESAVENTO et al., 2008).

2.4 Sinais Clínicos

Alguns sinais clínicos podem ser causados tanto pelo FeHV-1 como pelo FCV, e por este motivo, a enfermidade é frequentemente citada como CRF (THIRY et al., 2009; RADFORD et al., 2009). Contudo, existem alguns sinais clínicos que podem ser associados preferencialmente a um agente.

Sinais respiratórios causados pelo FeHV-1 geralmente se restringem ao trato respiratório superior, como espirros e secreção nasal, e em casos mais graves, dispneia e tosse. Lesões teciduais podem ocorrer principalmente em animais jovens, gerando uma rinosinusite crônica. Em determinados casos, o trato respiratório inferior também pode ser acometido, com o FeHV-1 atingindo o epitélio pulmonar e causando quadros de pneumonia (STILES, 2003; RODRIGUEZ et al., 2017). Lesões oculares de córnea e conjuntiva são comumente causadas pelo FeHV-1. Este vírus pode causar úlceras dendríticas de córnea (sinal patognômico), além de outros sinais, como conjuntivite acompanhada de secreção ocular, hiperemia, quemose e até mesmo a união entre conjuntivas, denominada simbléfaro, quando a infecção ocorre em animais jovens. Quando recrudescências ocorrem de forma frequente, as lesões de córnea causadas pelo agente podem se tornar crônicas, gerando o quadro denominado de ceratite estromal crônica. Esta manifestação está relacionada a respostas imunológicas ineficazes frente ao FeHV-1, causando a fibrose do tecido. Além disso, outras manifestações oculares como sequestro corneal, ceratite eosinofílica e ceratoconjuntivite seca são associadas ao FeHV-1 (ANDREW, 2001; GOULD, 2011). Embora raros, quadros de dermatite ulcerativa podem ocorrer, cursando com necrose de epiderme e derme, além de inflamação facial, principalmente em plano nasal (HARGIS & GINN, 1999; PORCELLATO et al., 2018).

Diversas manifestações clínicas podem ser causadas ou associadas ao FCV. Dentre as injúrias em cavidade oral, a glossite ulcerativa é destacada como um sinal característico. Geralmente inicia com vesículas, principalmente nas margens e

extensão da língua, que coalescem e, posteriormente, se rompem (RADFORD et al., 2007). Quadros de complexo gengivite-estomatite crônica (CGE), caracterizados por periodontite intensa devido ao envolvimento de respostas imunomediadas são comumente associados ao FCV (LYON, 2005; DOWERS et al., 2010; THOMAS et al., 2017; NAKANISHI et al., 2018).

Cepas mais virulentas de FCV podem apresentar tropismo pelo epitélio pulmonar, atingindo o trato respiratório inferior e causando quadros de broncopneumonia (PESAVENTO et al., 2008). Estudos mais recentes identificaram macrófagos alveolares como as principais células-alvo do vírus neste órgão (RODRIGUEZ et al., 2014). Apesar de escasso, há ainda a descrição de cepas capazes de causar lesões articulares como sinovite aguda, manifestada nos animais através de claudicação (PESAVENTO et al., 2008).

Nos últimos anos, diversos relatos vêm associando o FCV com manifestações clínicas mais graves do que as descritas anteriormente. Estas cepas mais virulentas, denominadas de VS-FCV causam sinais clínicos sistêmicos e agressivos, como edema generalizado, icterícia, úlceras generalizadas de pele, pneumonia, distúrbios coagulatórios e, frequentemente, levam à morte tanto animais jovens como adultos e vacinados. Até o momento, nenhuma característica genética comum foi observada nas cepas envolvidas nestas manifestações fatais (PEDERSEN et al., 2000; HURLEY et al., 2004; DESCHAMPS et al., 2015; CARINGELLA et al., 2019).

2.5 Diagnóstico

O diagnóstico de CRF é comumente realizado com base apenas nos sinais clínicos. Entretanto, como alguns destes sinais se confundem entre os agentes, a confirmação por testes laboratoriais é extremamente importante. Além disso, a identificação dos patógenos envolvidos, principalmente em locais de alta densidade populacional, permite a implementação de medidas de prevenção direcionada aos agentes causadores (COHN, 2011).

Tanto o FeHV-1, como o FCV produzem efeito citopático (ECP) em cultivos celulares, sendo uma alternativa para o diagnóstico. O FeHV-1 produz ECP característico da família *Herpesviridae*, como arredondamento celular, desprendimento do tapete e formação de aglomerados que remetem à “cachos de uva”. O FCV se dissemina rapidamente em cultivo, gerando ECP semelhante ao

FeHV-1, como arredondamento celular e desprendimento do tapete. Como coinfeções são frequentes e o ECP pode ser indistinguível entre os agentes em células da linhagem CRFK (*Crandell Reese feline kidney*), sendo necessárias técnicas adicionais de identificação viral. O ICC (isolamento em cultivo celular), apesar de ser uma técnica padrão-ouro de diagnóstico, necessita de partículas virais íntegras e viáveis para que o ECP possa ser visualizado (SOSNOVTSEV et al., 2003; RADFORD et al., 2009; FRANCO et al., 2017).

Técnicas moleculares como a PCR e RT-PCR estão sendo cada vez mais utilizadas, pela sua alta sensibilidade e especificidade. É importante que regiões conservadas do genoma dos vírus sejam escolhidas como alvo dos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*), permitindo que mesmo vírus com alta taxa de mutação, como o FCV, tenham maior chance de serem detectados (RADFORD et al., 2009; THIRY et al., 2009). Para aumentar a sensibilidade na detecção dos agentes, ambas as técnicas, PCR ou RT-PCR e ICC podem ser associadas (MELI et al., 2018). Ainda, a utilização de técnicas como *nested*-PCR ou PCR em tempo real (*real time* PCR ou qPCR), tem vantagem pela sensibilidade superior em relação ao PCR convencional, além da possibilidade de quantificação viral pela qPCR (BRUM & WEIBLEN, 2017).

Como amostras, *swabs* de mucosa orofaríngea ou oral, nasal e conjuntival podem ser utilizadas para o diagnóstico. As amostras devem ser mantidas em meio de transporte viral e refrigeradas durante o envio ao laboratório. Devem preferencialmente, ser processadas imediatamente, a fim de evitar a degradação do material genético e obtenção de resultados falso-negativos (MELI et al., 2018). A coleta e processamento de amostra de diferentes mucosas de um mesmo animal pode aumentar as chances de detecção dos agentes, visto que muitas vezes estão presentes em somente uma das mucosas nos animais acometidos, e nem sempre são relacionadas à região onde se observam os sinais clínicos (SCHULZ et al., 2015).

ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) e a vírus-neutralização (VN) são descritos como alternativas de diagnóstico sorológico. Contudo, não permitem a diferenciação entre animais infectados naturalmente e vacinados. Animais portadores serão positivos em tais técnicas, não tendo valor confirmatório da enfermidade nestes casos (RADFORD et al., 2009; THIRY et al., 2009). Além disso, a imunofluorescência (IFA) também é descrita como método de diagnóstico para amostras de tecido (RADFORD et al., 2009; GOULD, 2011).

2.6 Profilaxia e Controle

A vacinação contra o FeHV-1 e o FCV, juntamente com o *Protoparvovirus dos carnívoros 1* (*Carnivore protoparvovirus 1*, CPPV-1), anteriormente denominado de *Vírus da panleucopenia felina* (*Feline panleukopenia virus*, FPLV), é considerada essencial para todos os felinos domésticos (DAY et al., 2016). Contudo, as vacinas disponíveis não previnem a infecção e desenvolvimento do estado do carreador assintomático pelo FCV, e nem mesmo proteção contra todas as cepas existentes, pela alta variabilidade genética (RADFORD et al., 2009). As cepas vacinais de FCV também não são capazes de prevenir a enfermidade sistêmica, causada por cepas mais virulentas (SCHORR-EVANS et al., 2003). A infecção natural ou vacinação frente ao FeHV-1, da mesma forma, não induz uma resposta imune capaz de prevenir a infecção e estabelecimento da condição de portador, o que possibilita reativação viral em períodos de estresse (THIRY et al., 2009), o que pode comprometer a transmissão dos agentes à animais suscetíveis (DAY et al., 2016). Ainda assim, as vacinas são eficazes em reduzir sinais clínicos associados aos agentes e auxiliam na redução da excreção viral (COHN, 2011).

Vacinas vivas-modificadas e vacinas inativadas são disponíveis comercialmente. Produtos de aplicação intranasal com vírus vivo-modificado, comercializados no exterior, têm vantagem pela indução mais rápida de resposta imunológica, entretanto podem causar sinais clínicos em alguns animais após sua utilização (COHN, 2011). Enquanto a vacinação frente ao FCV induz basicamente resposta imune humoral, a vacinação frente ao FeHV-1 é capaz de induzir tanto imunidade celular quanto humoral (RADFORD et al., 2009; THIRY et al., 2009).

Em abrigos e locais onde há maior circulação de felinos, recomenda-se a quarentena e vacinação de qualquer animal novo introduzido no local. Gatis de criação devem manter um protocolo de vacinação de fêmeas antes do período de acasalamento, visto que a imunização com vacinas vivas-modificadas durante a gestação não é recomendada, mas objetiva-se evitar a infecção de ninhadas nos primeiros meses de vida através de imunidade passiva (RADFORD et al., 2009; THIRY et al., 2009). Além disso, medidas de desinfecção ambiental devem ser tomadas com especial atenção ao FCV, pela maior resistência ambiental que este agente possui. Desinfetantes como hipoclorito de sódio a 5% diluído nas proporções 1:32, são considerados eficazes (RADFORD et al., 2009).

3 Artigo

High occurrence of *Felid alphaherpesvirus 1* and *Feline calicivirus* in domestic cats from southern Brazil

Alice Silveira Becker, Francielle Liz Monteiro, Ana Carolina de Assis Scariot, Domitila Brzoskowski Chagas, Geferson Fischer, Marcelo de Lima, Silvia de Oliveira Hübner

Artigo será submetido à revista Pesquisa Veterinária Brasileira

High occurrence of felid alphaherpesvirus 1 and feline calicivirus in domestic cats from southern Brazil

Alice Silveira Becker¹, Francielle Liz Monteiro¹, Ana Carolina de Assis Scariot¹, Domitila Brzoskowski Chagas¹, Geferson Fischer¹, Marcelo de Lima¹, Silvia de Oliveira Hübner^{1*}

ABSTRACT. – Becker, A. S., Monteiro, F. L., Scariot, A. C. A., Chagas, D. B., Fischer, G., Lima, M., Hübner, S. O. 2020. **High occurrence of felid alphaherpesvirus 1 and feline calicivirus in domestic cats from southern Brazil.**

¹Laboratório de Virologia e Imunologia, Faculdade de Veterinária, Departamento de Veterinária Preventiva, Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), Campus Capão do Leão, Pelotas, RS 96010-900, Brazil. E-mail: sohubner@yahoo.com.br

Felid alphaherpesvirus 1 (FeHV-1) and feline calicivirus (FCV) affect cats worldwide. The aim of this study was to evaluate the frequency of occurrence of FeHV-1 and FCV in cats with clinical signs of respiratory, oral and/or ocular disease. Samples were collected from cats cared for in veterinary ambulatory and clinics and submitted to molecular detection and viral isolation. Of the 49 cats evaluated, 45 (92%) were positive for at least one of the viruses; 82% (40/49) were positive for FeHV-1 and 41% (20/49) for FCV. Of these, 31% (15/49) were coinfection cases. For FeHV-1, 45% (18/40) of the cats tested were positive from the collection of eye swab, and the same percentage (9/20) was obtained for the FCV by the oral swab. FeHV-1 and/or FCV were isolated in 35% (17/49) of the samples. The main clinical sign observed was ocular secretion in 71% (35/49) of cats, characterized as mild serous, purulent or serosanguineous, and in some cases associated with ocular injury and marked chemosis. Our findings demonstrate the high occurrence of FeHV-1 and FCV in domestic cats in southern Brazil and indicate that measures should be implemented to improve the diagnostic, prevention and management against of these important diseases.

INDEX TERMS: Cat, Feline Respiratory Disease Complex, FRDC, FCV, FeHV-1.

RESUMO.- [Alta ocorrência de alphaherpesvirus felideo e calicivirus felino em gatos domésticos no sul do Brasil] Felid alphaherpesvirus 1 (FeHV-1) e Calicivirus felino (FCV) afetam gatos mundialmente. O objetivo deste estudo foi identificar a frequência de ocorrência de FeHV-1 e FCV em gatos com sinais clínicos de doença respiratória, oral e/ou ocular. Amostras foram coletadas de gatos atendidos em ambulatório e clínicas veterinárias e submetidas à detecção molecular e isolamento viral. Dos 49 gatos avaliados, 45 (92%) foram positivos para ao menos um dos vírus; 82% (40/49) foram positivos para o FeHV-1 e 41% (20/49) para o FCV. Destes, 31% (15/49) foram casos de coinfeção. Para o FeHV-1, 45% (18/40) dos gatos foram positivos na coleta do *swab* ocular, e o mesmo percentual (9/20) foi obtido para o FCV a partir do *swab* oral. FeHV-1 e/ou FCV foram isolados em 35% (17/49) das amostras. O principal sinal clínico observado foi secreção ocular em 71% (35/49) dos gatos, caracterizada como serosa, purulenta ou serossanguinolenta e, em alguns casos, associada à lesão e quemose. Nossos resultados demonstram a alta ocorrência de FeHV-1 e FCV em gatos domésticos na região sul do Brasil e indicam que devem ser implementadas medidas para melhorar o diagnóstico, a prevenção e o manejo contra essas importantes doenças.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Gato, Complexo Respiratório Felino, CRF, FCV, FeHV-1.

INTRODUCTION

Felid alphaherpesvirus 1 (FeHV-1) and feline calicivirus (FCV) are a frequent cause of diseases in the domestic feline population. Transmission occurs through nasal, ocular and oral discharges, by direct contact between cats, or even by fomites (Cohn 2011). Both agents are distributed worldwide, with higher prevalence in settings where large numbers of cats coexist, including animal shelters and colonies (Radford et al. 2009, Thiry et al. 2009). FeHV-1 is a double-stranded DNA virus that belongs to the family *Herpesviridae* (Gaskell et al. 2007, ICTV 2018). Like other agents of the family, the significant characteristic of the virus is the establishment of latent infection, in this case occurring in the trigeminal ganglia (Gaskell et al. 2007). FeHV-1 causes clinical signs like nasal and ocular discharge, conjunctivitis and keratitis, with dendritic corneal ulcers as its pathognomonic clinical sign. Other clinical signs like pneumonia, facial dermatitis, stomatitis and meningoencephalitis are also described (Hora et al. 2013, McGregor et al. 2016, Rodriguez et al. 2016, Argenta et al. 2017, Porcelatto et al. 2018).

FCV is a single-stranded positive sense RNA virus, belonging to the family *Caliciviridae* (ICTV 2018). It is a non-enveloped agent, being highly resistant in the environment (Meyers et al. 1991, Radford et al. 2007, Radford et al. 2009). Some cats remain asymptomatic carriers after acute infection of FCV, being a source of infection for other susceptible cats (Gaskell et al. 2007). FCV is associated with different clinical patterns, including respiratory symptoms, oral ulcerations, and gingivitis/stomatitis (Afonso et al. 2017, Nakanishi et al. 2018).

Knowledge of the major viruses circulating in a region is fundamental to establish of prevention and control measures. Thus, the present study aimed at identifying the frequency of occurrence of FeHV-1 and FCV in cats from southern Brazil.

MATERIALS AND METHODS

Animals and samples. Samples were collected during January to June of 2019 from 49 cats from veterinary clinics and an ambulatory associated to the Federal University of Pelotas (UFPEL) in the city of Pelotas (Latitude: 31° 46' 19" S Longitude: 52° 20' 33" W), located in southern Rio Grande do Sul (Brazil). Information regarding sex, age and clinical manifestations were obtained from each animal. The experiments were approved by the Institutional Committee on Animal Welfare and Ethics (UFPEL - approval number 57742-2018).

The samples consisted of conjunctival, nasal and oral/oropharyngeal swabs collected from cats with clinical signs like conjunctivitis, ocular and nasal discharges, sneezing, coughing, oral ulcers and gingivitis-stomatitis complex (CGS). The swabs were immersed in 0.5 mL of minimum essential medium (MEM) and immediately processed or stored in RNeasy Lysis Solution (Qiagen, EUA) and maintained at -70°C until use. 0.2 mL was used for viral isolation in cell culture and 0.15 mL for extraction of nucleic acids (DNA or RNA).

Cell culture and virus isolation. The feline kidney cell line CRFK (Crandell-Reese feline kidney) was used for isolation and amplification of the viruses. Cells were routinely maintained in MEM supplemented with 10% fetal bovine serum, containing antibiotics and antifungal (penicillin 200.000 UI/L, streptomycin 200 mg/L, enrofloxacin 5 mg/L and amphotericin B 2.5 mg/L). The swabs were subjected to vortex and the content was then transferred to tubes and centrifuged at 3.000 x g for 3 minutes. The supernatants were inoculated onto CRFK cell monolayers grown in 24-well plates and were submitted to three passages of five days each, while the cells were monitored for cytopathic effect. The strains B927 FeHV-1 and SV1425/93 FCV were used as positive controls (provided from Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor – IPVDF, Porto Alegre/RS and Setor de Virologia da Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria/RS) and cells with only MEM were used as negative control.

Nucleic acid extraction and PCR. DNA extractions were performed using ReliaPrep™ Viral Total Nucleic Acid Extraction (Promega, Wisconsin, EUA), according to the manufacturer's instructions. DNA was submitted to PCR assay for the thymidine kinase enzyme (TK) gene, using the primers Herp_F: 5'-GACGTGGTGAATTATCAGC-3' and Herp_R: 5'-CAACTAGATTTCCACCAGGA-3' (Sykes et al. 1997). The conditions were: 94°C for 5 minutes, 40 cycles of 94, 56 and 72°C for 45, 30 and 45 seconds, respectively, and 72°C for 7 minutes.

RNA extraction was performed using TRIzol® Reagent, according to the manufacturer's instructions. After RNA extraction, complementary DNA (cDNA) was synthesized using iScript™ cDNA Synthesis (Bio-Rad). Briefly, total RNA (~500 ng) was mixed with 5x Reaction Mix and 1U Reverse Transcriptase. The samples were incubated for 5 minutes at 25°C, followed by incubation at 46°C for 20 minutes and 95°C for 1 minute. The synthesized cDNAs were submitted to Nested PCR assay for A-B conserved region of ORF2 (capsid protein gene), using the primers Cali1: 5'- AACCTGCGCTAACGTGCTTA-3', Cali2: 5'- CAGTGACAATACACCCAGAAG -3', and at second round, Cali3: 5'- TGGTGATGATGAATGGGCATC -3' and Cali4: 5'- ACACCAGAGCCAGAGATAGA-3' (Marsilio et al. 2005). The conditions were: 94°C for 3 minutes, 35 cycles of 94, 50 and 72°C for 1 minute, 45 seconds and 1 minute, respectively, and 72°C for 7 minutes.

The PCR reaction was performed in a 25 µL volume, using 100-200 ng of DNA or cDNA template, 1x GoTaq® Colorless Master Mix (Fitchburg, Wisconsin, EUA) and 0.4 µM of each primer. RNA extracted from the CRFK was used as negative control and strains B927 and SV1425/93 were used as control of FeHV-1 and FCV, respectively. PCR products of FeHV-1 and RT-PCR of FCV were resolved in a 1.5% agarose gel stained (Blue Green Loading Dye I, LGC Biotecnologia, São Paulo, BR) and visualized under ultraviolet (UV) light after electrophoresis (100 V, 40 minutes).

Sequencing analysis. PCR products were purified using PureLink® Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo Kit (Life Technologies, CA, USA). Positive samples were sequenced in duplicate using the BigDye kit. Results were analyzed by the Staden program (Staden 1996) to obtain a consensus sequence, and the alignment of sequences with those from GenBank and identity matrix was performed using the BioEdit Sequence Alignment Editor Software suite 7.0.5.3. The translation of a nucleotide sequence to a protein sequence was performed using the ExpAsy Bioinformatics (<https://web.expasy.org/translate/>).

RESULTS AND DISCUSSION

Samples of eye, oral/oropharyngeal and nasal swabs were obtained from 49 symptomatic cats located in the South of Brazil, during the period of January to June of 2019. According to age, 20 animals were classified as kittens (<1 year), nine as young (1-2 years), 15 as adults (3-7 years) and five as elders (≥ 8 years), and consisted of 32 males

and 17 females. Regarding vaccination status, only 4% (2/49) were vaccinated, 71% (35/49) were not vaccinated and 24% (12/49) had unknown vaccination status. Besides, 67% (33/49) of the animals had outdoor access.

All samples collected were evaluated by PCR for FeHV-1 and nested RT-PCR for FCV. FeHV-1 amplified product in PCR resulted in a fragment of 287bp. FCV amplified product in Nested RT-PCR resulted in a 924bp fragment in first round, and a 467bp fragment in the second round. Of the 49 cats, 45 (92%) were positive for at least one of the viruses. Among the positive animals, were 100% (20/20) of the kittens, 100% (9/9) of the young ones, 73.3% (11/15) of the adults and 100% (5/5) of the elders. Besides, 88.5% (31/35) of the not vaccinated group were positive, 100% (2/2) of the cats with no historical of previous vaccination and 100% (12/12) of the cats with unknown vaccination status. Among the animals without outdoor access, 75% (3/4) were positive, along with 100% (33/33) of the cats with outdoor access and 75% (9/12) of the animals where this information was not available.

For FeHV-1, 82% (40/49) were positive, and for FCV, 41% (20/49) of positivity was obtained. Thirty one percent (15/49) were cases of coinfection. These results demonstrate a high occurrence of these viruses in the studied population, especially regarding FeHV-1. Besides, these data are higher than what is described in Germany (Schulz et al. 2015), Spain (Fernandez et al. 2017), and Australia (Nguyen et al. 2018), where molecular detection studies involving symptomatic animals were also conducted, showing wide variations in the detection of these agents according to different geographic regions. The rate of occurrence detected in our study indicates the high circulation of these viruses in this region, which could be explained by the outdoor lifestyle and the unvaccinated status of the majority of the animals. Vaccines for FeHV-1 and FCV are essential for all cats (Day et al. 2016) and considered effective in reducing clinical signs and viral excretion, although they are not capable to completely avoid infection and transmission of the agents (Radford et al., 2009; Thiry et al. 2009). In addition, protection by vaccination against FCV may be affected by the high variability of existing strains (Radford et al. 2009). Thus, even vaccinated animals can be infected and act as carriers, spreading these agents.

In Southern Brazil, previous serological studies detected FCV and FeHV-1 in the feline population, both in vaccinated and non-vaccinated animals (Johann et al. 2009, Henzel et al. 2013). During the years from 2006 to 2009, a study was conducted to identify feline calicivirus and feline herpesvirus in southern Brazil, evaluating both symptomatic and asymptomatic cats, which makes it difficult to compare their results to the ones found in the present study. This same study found 38.2% (21/55) of positivity for FeHV-1 and 52.7% (29/55) for FCV, with coinfection in 9.1% (5/55) (Henzel et al. 2012).

Our data show a higher occurrence of FeHV-1 compared to FCV. This result can be partly explained by FeHV-1 pathogenesis. FeHV-1 remains latent in infected animals, and eventually, mainly in cases of immunosuppression or stressful conditions, returns to the lytic cycle and is reexcreted in the primary sites of infection. Possibly, the FeHV-1 detected in these cats was the cause of acute clinical signs due primary infection, but also, especially in adult cats, FeHV-1 developed the disease at the time of viral reactivation. The disease as a consequence of virus recrudescence may be consequence of immunosuppression caused by other factors or diseases that were not investigated. FCV, on the other hand, can be detected in healthy animals due to the carrier state that occurs in some animals. In these cases, the virus remains replicating and being eliminated through secretions, although no apparent symptomatology is identified (Radford et al. 2009; Franco et al. 2017). Anyway, the data clearly show high circulation and occurrence of FeHV-1 and FCV in the studied population.

The virus was isolated in 35% (17/49) of the cats, being 47% (8/17) from oral swabs, 29% (5/17) ocular swab, 18% (3/17) from the eye and oral swab, and 6% (1/17) from the oral and nasal swab. Figure 1 shows the FeHV-1 and FCV molecular detection according to the place of swab collection (oral/oropharyngeal, ocular or nasal regions). For FeHV-1, 45% (18/40) of the cats were positive from the collection of eye swab, and the same percentage (9/20) was obtained for the FCV from the oral swab. In 27.5% (11/40) of animals positive for FeHV-1 and 30% (6/20) positive for FCV, virus detection was possible from both oral and eye swab. These results corroborate with previous studies, where the main FCV detection location was from the oral/oropharyngeal mucosa (Schulz et al. 2015). However, in this same study, no difference was observed among the collection sites for FeHV-1, suggesting oral/oropharyngeal swab as the sample of choice for the detection of both viruses. The results obtained in the present study highlight the importance to collect samples from more than one region, in order to increase the possibility of detecting the agents. The detection of FeHV-1 and/or FCV from nasal swabs was only possible in four animals, possibly due to the greater difficulty encountered at the time of sampling of the mucosa, a fact that was also reported by Schulz et al. (2015).

Figure 2 show the clinical signs observed in animals evaluated. Ocular secretion was observed in 71% (35/49) of cats and was characterized as mild serous, purulent or serosanguineous, and in some cases associated with ocular injury and marked chemosis. The second most frequent clinical sign was nasal discharge in 39% (19/49) of cats, ranging from mild serous to purulent, followed by CGS in 24% (12/49), sneezing in 18% (9/49), cough in 6% (3/49), respiratory rattle in 4% (2/49) and dyspnea in 4% (2/49). The main clinical sign in FCV-positive animals was CGS, identified in 58% (7/12) of the animals. Despite CGS having multifactorial causes (Lyon 2005), it is often associated with FCV (Fernandez et al. 2017; Thomas et al. 2017; Nakanishi et al. 2018). FeHV-1, on the other hand, was detected in 50% (18/36) of animals exhibiting nasal and/or ocular secretion. To compare, Fernandez et al. (2017) detected FeHV-1 in 28% (36/127) of animals showing clinical signs related to upper

respiratory tract disease and 24% (36/149) of animals with conjunctivitis. It is known that other agents may be involved in respiratory and/or ocular disease in cats, also called “feline respiratory disease complex” (FRDC), especially *Bordetella bronchiseptica* and *Clamidophyla felis* (Cohn 2011). Clinical signs in these cases are similar to FeHV-1 or FCV infection, and can cause confusion. Symptomatic animals in our study that were negative for both FeHV-1 and FCV could have an infection by these other agents. Our study shows that the most common pathogens associated with FRDC in southern Brazil are FeHV-1 and FCV.

The PCR product of FeHV-1 was sequenced and subjected to analysis, showing nucleotide (nt) identity of 99.7 to 100% with FeHV-1 sequences deposited with GenBank. Analysis about the nt and amino acid (aa) identity performed with isolated FCV detected high genetic variability in comparison with vaccine strain F9, ranging from 76.1 to 77.4 (nt) and 87.4 to 88.9 (aa), even though the more conserved regions of FCV capsid (regions A and B) were analyzed. This result may serve as an alert to possible vaccine failures in this region. In general, the level of heterologous protection will depend on the virus strains involved (Radford et al. 2009). Analysis about the nt and aa identity between the FCV sequences in this study was 88.8 to 97.4% and 99.2 to 100%, respectively.

CONCLUSIONS

Our findings demonstrate high occurrence of *Felid alphaherpesvirus 1* and *Feline calicivirus* in domestic cats in southern Brazil. This information can be used to improve measures about diagnostic, prevention and management against these important cat diseases.

Acknowledgements

The publication of this paper was partially supported by PRPPGI/UFPel and CAPES. FL Monteiro was the recipient of a PNP/CAPEL fellowship (Programa Nacional de Pós-Doutorado/Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

Conflict of interest statement

The authors declare that they have no conflict of interest.

REFERENCES

- Afonso M. M., Pinchbeck G. L., Smith S. L., Daly J. M., Gaskell R. M., Dawson S., Radford A. D. 2017. A multi-national European cross-sectional study of feline calicivirus epidemiology, diversity and vaccine cross-reactivity. *Vaccine*. 35:2753-2760.
- Argenta F. F., Ramos B. C., Fredo G., Laisse C. J. M., Rolim V. M., Cargnelutti J. F., Flores E. F., Pavarini S. P., Costa F. V. A., Driemeier D. 2017. Ulcerative dermatitis caused by feline herpesvirus type 1 in a domestic cat. *Semina: Cienc. Agrár.* 38:2857-2862.
- Caringella F., Elia G., Decaro N., Martella V., Lavane G., Varello K., Catella C., Diakoudi G., Carelli G., Colaianni M. L., Bo S., Bounavoglia C. 2019. Feline calicivirus infection in cats with virulent systemic disease, Italy. *Res. Vet. Sci.* 124:46-51.
- Cohn L. A. Feline Respiratory Disease Complex. 2011. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 41:1273-1289.
- Coyne, K. P.; Edwards, D.; Radford, A. D.; Cripps, P.; Jones, D.; Wood, J. L. N. Gaskell, R. M., Dawson, S. 2007. Longitudinal molecular epidemiological analysis of feline calicivirus infection in an animal shelter: a model for investigating calicivirus transmission within high-density, high-turnover populations. *J. Clin. Microbiol.* 45:3239-3244.
- Day M. J., Horzinek M. C., Schultz R. D., Squires, R. A. 2016. Guidelines for the vaccination of dogs and cats - Compiled by the Vaccination Guidelines Group (VGG) of the World Small Animal Veterinary Association (WSAVA). *J. Small Anim. Pract.* 57:1-45.
- Fernandez M., Manzanilla E. G., Lloret A., León M., Thibault J. C. 2017. Prevalence of feline herpesvirus-1, feline calicivirus, *Clamidophyla felis* and *Mycoplasma felis* DNA and associated risk factors in cats in Spain with upper respiratory tract disease, conjunctivitis and/or gingivostomatitis. *J. Feline Med. Surg.* 19:461-469.
- Gaskell R. 2007. Feline Herpesvirus. *Vet. Res.* 38:337-354.
- Guo H., Miao Q., Zhu J., Yang Z., Liu G. 2018. Isolation and molecular characterization of a virulent systemic feline calicivirus isolated in China. *Infect. Genet. Evol.* 65:425-429.

- Henzel A., Brum M. C. S., Lautert C., Martins M., Lovato L. T., Weiblen R. 2012. Isolation and identification of feline calicivirus and feline herpesvirus in Southern Brazil. *Braz. J. Microbiol.* 43:560-568.
- Henzel A., Brum M. C. S., Lovato L. T., Weiblen R. 2013. Serological survey of feline calicivirus and felid herpesvirus in Rio Grande do Sul, Brazil. *Acts Sci. Vet.* 41:1-6.
- Hora A. S., Toniatti P. O., Guerra J. M. Leme M. C., Pena H. F. J., Maiorka, P. C., Brandão P. E. 2013. Felid herpesvirus 1 as a causative agent of severe nonsuppurative meningoencephalitis in a domestic cat. *J. Clin. Microbiol.* 51:676-679.
- Hou J., Sánchez-Vizcaíno F., Mcgahie D., Lesbros, C., Almeras, T., Howarth, D., O'Hara V., Dawson S., Radford A. D. 2016. European molecular epidemiology and strain diversity of feline calicivirus. *Vet Rec.* 178:114-121.
- Hurley K. E., Pesavento P. A., Pedersen N. C., Poland A. M., Wilson E., Foley J. E. 2004. An outbreak of virulent systemic feline calicivirus disease. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 224:241-249.
- International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV), <<https://talk.ictvonline.org>>, 2018.
- Johann J. M., Caetano C. F., Hass R., Guim T. N., Fischer G., Vargas G. D., Vidor T., Hübner S. O. 2009. Serum survey for antibodies to coronavirus, herpesvirus, calicivirus, and parvovirus in domestic cats from Rio Grande do Sul, Brazil. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 61:752-754.
- Marsilio F., Di Martino B., Decaro N., Buonavoglia C. 2005. A novel nested PCR for the diagnosis of calicivirus infections in the cat. *Vet. Microbiol.* 5:1-7.
- Meyers G., Wirblich C., Thiel H. J. 1991. Rabbit hemorrhagic disease virus--molecular cloning and nucleotide sequencing of a calicivirus genome. 184:664-676.
- McGregor G. F., Sheehan K., Simko E. 2016. Pneumonia and gastritis in a cat caused by feline herpesvirus-1. *Can. Vet. J.* 57:147-150.
- Nakanishi H., Furuya M., Soma T., Hayashiuchi Y., Yoshiuchi R., Matsubayashi M., Tani H., Sasai K. 2018. Prevalence of microorganisms associated with feline gingivostomatitis. *J. Feline Med. Surg.* 21:103-108.
- Nguyen D., Barrs V. R., Kelman M., Ward M. P. 2018. Feline upper respiratory tract infection and disease in Australia. *J. Feline Med. Surg.* 21:973-978.
- Pedersen N. C., Elliott J. B., Glasgow A., Poland A., Keel K. 2000. An isolated epizootic of hemorrhagic-like fever in cats caused by a novel and highly virulent strain of feline calicivirus. *Vet. Microbiol.* 73:281-300.
- Porcelatto I., Luciani L., Marenzoni M. L., Santagostino S. F., Sforza M., Mechelli L., Brachelente C. Feline herpesvirus ulcerative dermatitis: an atypical case? *Vet. Dermatol.* 29:258-e96.
- Radford A. D., Coyne K. P., Dawson S., Porter C. J., Gaskell R. M. 2007. Feline Calicivirus. *Vet. Res.* 38:319-335.
- Radford A. D., 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., Thiry E., Truyen U., Horzinek M. C. 2009. Feline Calicivirus Infection: ABCD guidelines on prevention and management. *J. Feline Med. Surg.* 11:556-564.
- Reynolds B. S., Poulet H., Pingret J. L., Jas D., Brunet S., Lemeter C., Etievant M., Boucraut-Baralon C. 2009. A nosocomial outbreak of feline calicivirus associated virulent systemic disease in France. *J. Feline Med. Surg.* 11:633-644.
- Rodriguez J. M. M., Leeming G., Köhler K., Kipar A. 2016. Feline herpesvirus pneumonia: investigations into the pathogenesis. *Vet. Pathol.* 54:922-932.
- Schorr-Evans E. M., Poland A., Johnson W. E., Pedersen N. C. 2003. An epizootic of highly virulent feline calicivirus disease in a hospital setting in New England. *J. Feline Med. Surg.* 5:217-226.
- Schulz C., Hartmann K., Mueller R. S., Helps C., Schulz B. S. 2015. Sampling sites for detection of feline herpesvirus-1, feline calicivirus and *Chlamydia felis* in cats with feline upper respiratory tract disease. *J. Feline Med. Surg.* 17:1012-1019.

Staden R. 1996. The Staden sequence analysis package. *Mol. Biothechnol.* 5:223-241.

Sykes J. E., Studdert V. P., Browing G. F. 1998. Detection and strain differentiation of feline calicivirus in conjunctival swabs by RT-PCR of the hypervariable region of the capsid protein gene. *Arch. Virol.* 143:1321-1334.

Thiry E., 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., Truyen U., Horzinek M. C. 2009. Feline Herpesvirus Infection: ABCD guidelines on prevention and management. *J. Feline Med. Surg.* 11:547-555.

Thomas S., Lappin D. F., Spears J., Bennett D., Nile C., Riggio M. P. 2017. Prevalence of feline calicivirus in cats with odontoclastic resorptive lesions and chronic gingivostomatitis. *Res. Vet. Sci.* v. 111:124-126.

Townsend W. M., Stiles J., Guptill-Yoran L., Krohne S. G. 2004. Development of a reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay to detect feline herpesvirus-1 latency-associated transcripts in the trigeminal ganglia and corneas of cats that did not have clinical signs of ocular disease. *Am. J. Vet. Res.* 65:314-319.

Townsend W. M., Jacobi S., Tai SH., Kiupel M., Wise A. G., Maes R. K. 2013. Ocular and neural distribution of feline herpesvirus-1 during active and latent experimental infection in cats. 9:1-9.

Figure captions

Figure 1. *Felid alphaherpesvirus-1* and *feline calicivirus* molecular detection according to swab collection site in 49 cats from southern Brazil. Numbers refers to the number of cats that tested positive in each site.

Figure 2. Clinical signs observed in 49 symptomatic cats evaluated. Numbers refers to the number of cats presenting each clinical sign.

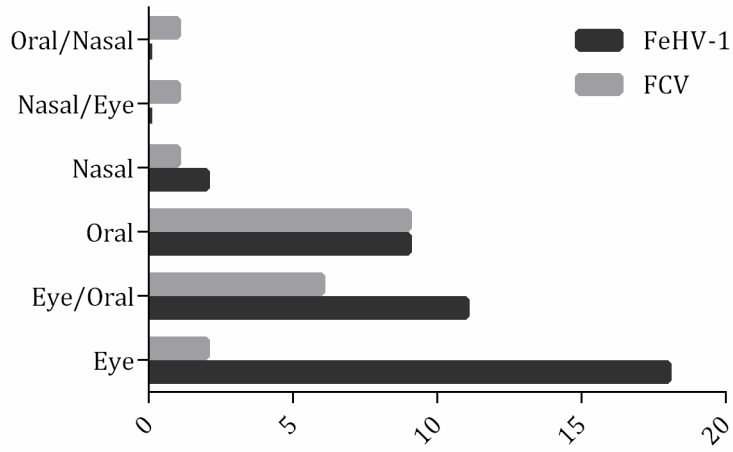


Figure 1. *Felid alphaherpesvirus-1* and *feline calicivirus* molecular detection according to swab collection site in 49 cats from southern Brazil. Numbers refers to the number of cats that tested positive in each site.

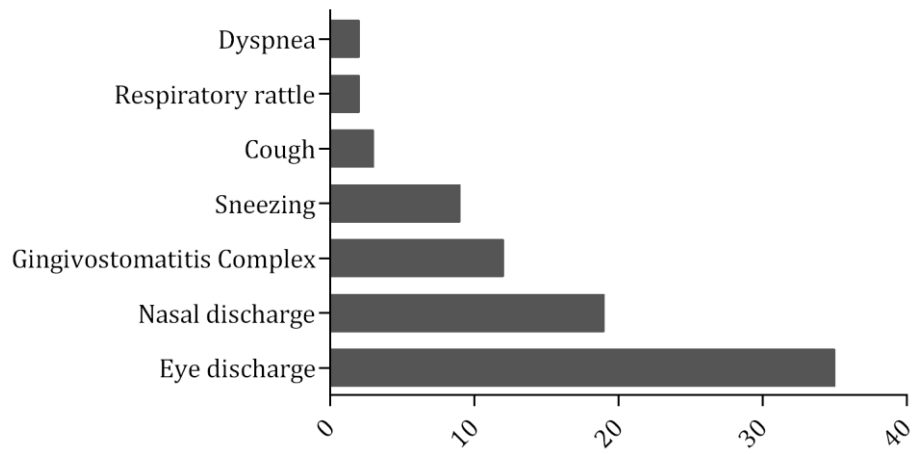


Figure 2. Clinical signs observed in 49 symptomatic cats evaluated. Numbers refers to the number of cats presenting each clinical sign.

4 Considerações finais

Os resultados descritos na presente dissertação permitem concluir que:

- Existe uma alta ocorrência de FeHV-1 e FCV em gatos sintomáticos ao sul do Rio Grande do Sul, Brasil.

- O FeHV-1 é detectado principalmente em amostras de *swabs* oculares, e o FCV em amostras de *swabs* orais, assim, a coleta de amostras em mais de uma mucosa pode auxiliar no diagnóstico;

- O sinal clínico observado com maior frequência em animais positivos para FeHV-1 é a secreção ocular, e para FCV, o complexo gengivite-estomatite, porém, não são conclusivos para tais diagnósticos;

Referências

AFONSO, M. M.; et al. A multi-national European cross-sectional study of feline calicivirus epidemiology, diversity and vaccine cross-reactivity. **Vaccine**. v. 35, n. 20, p. 2753-2760, 2017. DOI: 10.1016/j.vaccine.2017.03.030. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X17303365?via%3Dihub>. Acesso em: 12 out 2019.

ANDREW, S. Ocular manifestations os feline herpesvirus. **Journal of Feline Medicine and Surgery**. v. 3, n. 1, p. 9-16, 2001. DOI: 10.1053/jfms.2001.0110. Disponível em: https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1053/jfms.2001.0110?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%3dpubmed. Acesso em: 20 out 2019.

ARGENTA, F. F.; et al. Ulcerative dermatitis caused by feline herpesvirus type 1 in a domestic cat. **Semina: Ciências Agrárias**. v. 38, n. 4, p. 2857-2862, 2017. DOI: 10.5433/1679-0359.2017v38n4Supl1p2857. Disponível em: <http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/view/26712>. Acesso em: 14 out 2019.

BHELLA, D.; et al. Structural Insights into Calicivirus Attachment and Uncoating. **Journal of Virology**. v. 82, n. 16, p. 8051-8058, 2008. DOI: 10.1128/JVI.00550-08. Disponível em: <https://jvi.asm.org/content/82/16/8051.long>. Acesso em: 25 out 2019.

BRUM, M. C. S.; WEIBLEN, R. Detecção, identificação e quantificação de vírus. In: FLORES, E. F. (Org). **Virologia Veterinária: Virologia Geral e Doenças Víricas**. p. 43-70, 3ª ed., editora UFSM, Santa Maria, 2017.

CARINGELLA, F.; et al. Feline calicivirus infection in cats with virulent systemic disease, Italy. **Research in Veterinary Science**. v. 124, p. 46-51, 2019. DOI: 10.1016/j.rvsc.2019.02.008. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0034528818331801?via%3Dihub>. Acesso em: 02 nov 2019.

CASTRO, T. X.; et al. Detection and molecular characterization of caliciviruses (vesivirus and norovirus) in an outbreak of acute diarrhea in kittens from Brazil. **Veterinary Journal**. v. 206, n. 1, p. 115-117, 2015. DOI: 10.1016/j.tvjl.2015.06.014. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1090023315002713?via%3Dihub>. Acesso em: 31 out 2019.

COHN, L. Feline Respiratory Disease Complex. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**. v. 41, n. 6, p. 1273-1289, 2011. DOI: 10.1016/j.cvsm.2011.07.006. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0195561611001380?via%3Dihub>. Acesso em: 20 out 2019.

COYNE, K. P.; et al. Longitudinal molecular epidemiological analysis of feline calicivirus infection in an animal shelter: a model for investigating calicivirus transmission within high-density, high-turnover populations. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 45, n. 10, p. 3239-324, 2007. DOI: 10.1128/JCM.01226-07.

Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2045375/#!po=65.7895>. Acesso em: 18 out 2019.

DAY, M. J.; et al. Diretrizes para a vacinação de cães e gatos compiladas pelo grupo de diretrizes de vacinação da Associação Veterinária Mundial de Pequenos Animais (WSAVA). **Journal of Small Animal Practice**. v. 57, p. 1-50, 2016.

<https://doi.org/10.1111/jsap.12431>. Disponível em:

https://www.wsava.org/WSAVA/media/PDF_old/2015-WSAVA-vaccination-guidelines-Full-version-Portuguese.pdf. Acesso em: 05 nov 2019.

DESCHAMPS, J-Y.; TOPIE, E.; ROUX, F. Nosocomial feline calicivirus-associated virulent systemic disease in a veterinary emergency and critical care unit in France.

Journal of Feline Medicine and Surgery. v. 1, p. 1-9, 2015. DOI:

10.1177/2055116915621581. Disponível em:

<https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1177/2055116915621581>. Acesso: 25 out 2019.

DOWERS, K. L.; et al. Association of *Bartonella* species, feline calicivirus, and feline herpesvirus 1 infection with gingivostomatitis in cats. **Journal of Feline Medicine and Surgery**. v. 12, n. 4, p. 314-321, 2010. DOI: 10.1016/j.jfms.2009.10.007.

Disponível em:

https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1016/j.jfms.2009.10.007?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%3dpubmed. Acesso em: 22 out 2019.

FERNANDEZ, M.; et al. Prevalence of feline herpesvirus-1, feline calicivirus, *Chlamydia felis* and *Mycoplasma felis* DNA and associated risk factors in cats in Spain with upper respiratory tract disease, conjunctivitis and/or gingivostomatitis.

Journal of Feline Medicine and Surgery. v. 19, n. 4, p. 461-469, 2017. DOI:

10.1177/1098612X16634387. Disponível em:

https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1177/1098612X16634387?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%3dpubmed. Acesso em: 15 out 2019.

FILONI, C.; et al. First evidence of Feline Herpesvirus, Calicivirus, Parvovirus, and Ehrlichia Exposure in Brazilian Free-ranging Felids. **Journal of Wildlife Diseases**. v. 42, n. 2, p.470-477, 2006. DOI: 10.7589/0090-3558-42.2.470. Disponível em:

<https://www.jwildlifedis.org/doi/10.7589/0090-3558-42.2.470>. Acesso em: 04 nov 2019.

FILONI, C.; et al. Surveillance using serological and molecular methods for the detection of infectious agents in captive Brazilian neotropical and exotic felids. **Journal**

of **Veterinary Diagnostic Investigation**. v. 24, n. 1, p. 166-173, 2012. DOI: 10.1177/1040638711407684. Disponível em: https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1177/1040638711407684?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%3dpubmed. Acesso: 04 nov 2019.

FRANCO, A. C.; et al. *Herpesviridae*. In: FLORES, E. F. (Org). **Virologia Veterinária: Virologia Geral e Doenças Víricas**. p. 519-584, 3ª ed., editora UFSM, Santa Maria, 2017.

FURTADO, M. M.; et al. Molecular detection of viral agents in free-ranging and captive neotropical felids in Brazil. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v. 29, n. 5, p. 660-668, 2017. DOI: 10.1177/1040638717720245. Disponível em: https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1177/1040638717720245?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%3dpubmed. Acesso em: 04 nov 2019.

GASKELL, C. J.; et al. Efficacy of an inactivated feline calicivirus (FCV) vaccine against challenge with United Kingdom field strains and its interaction with the FCV carrier state. **Research in Veterinary Science**. v. 32, n. 1, p. 23-26, 1982. DOI: 10.1016/S0034-5288(18)32431-7. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0034528818324317>. Acesso em: 20 out 2019.

GASKELL, R.; et al. Feline Herpesvirus. **Veterinary Research**. v. 38, n. 2 p. 337-354, 2007. DOI: 10.1051/vetres:2006063. Disponível em: <https://www.vetres.org/articles/vetres/abs/2007/02/v07073/v07073.html>. Acesso em: 25 out 2019.

GOULD, D. Feline Herpesvirus-1: Ocular manifestations, diagnosis and treatment options. **Journal of Feline Medicine and Surgery**. v. 13, n. 5, p. 333-346, 2011. 10.1016/j.jfms.2011.03.010. Disponível em: https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1016/j.jfms.2011.03.010?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%3dpubmed. Acesso em: 29 out 2019.

GUO, H.; et al. Isolation and molecular characterization of a virulent systemic feline calicivirus isolated in China. **Infection, Genetic and Evolution**. v. 65, p. 425-429, 2018. DOI: 10.1016/j.meegid.2018.08.029. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567134818306695?via%3Dihub>. Acesso em: 22 out 2019.

HARGIS, A. M.; GINN, P. E. Feline herpesivurs-1 associated facial and nasal dermatitis and stomatitis in domestic cats. **Dermatology**. v. 29, n. 6, p. 1281-1290, 1999. DOI: 10.1016/s0195-5616(99)50126-5. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0195561699501265?via%3Dihub>. Acesso em: 29 out 2019.

HENZEL, A.; et al. Isolation and identification of feline calicivirus and feline herpesvirus in Southern Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 43, n. 2, p. 560-568, 2012a. DOI: 10.1590/S1517-83822012000200017. Disponível em:

http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822012000200017. Acesso: 22 out 2019.

HENZEL, A.; et al. Genetic and phylogenetic analyses of capsid protein gene in feline calicivirus isolates from Rio Grande do Sul in southern Brazil. **Virus Research**. v. 163, n. 2, p. 667-671, 2012b. DOI: 10.1016/j.virusres.2011.12.008. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0168170211004965?via%3Di> hub. Acesso em: 15 nov 2019.

HENZEL, A.; et al. Serological survey of feline calicivirus and felid herpesvirus in Rio Grande Do Sul, Brazil. **Acta Scientiae Veterinariae**. v. 41, p. 1-6, 2013. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/296774942_Serological_Survey_of_Feline_Calicivirus_and_Felid_Herpesvirus_in_Rio_Grande_do_Sul_Brazil. Acesso em: 08 nov 2019.

HORA, A. S.; et al. Felid herpesvirus 1 as a causative agent of severe nonsuppurative meningoencephalitis in a domestic cat. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 51, n. 2, p. 676-679, 2013. DOI: 10.1128/JCM.02462-12. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3553892/#!po=65.0000>. Acesso em: 22 out 2019.

HOU, J.; et al. European molecular epidemiology and strain diversity of feline calicivirus. **Veterinary Record**. v. 178, n. 5, p. 114-121, 2016. DOI: 10.1136/vr.103446. Disponível em: <https://veterinaryrecord.bmj.com/content/178/5/114>. Acesso em: 20 out 2019.

HURLEY, K. F.; SYKES, J. E. Update on feline calicivirus: new trends. **The Veterinary Clinics: Small Animal Practice**. v. 33, n. 4, p. 759-772, 2003. DOI: 10.1016/s0195-5616(03)00025-1. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0195561603000251?via%3Di> hub. Acesso: 27 out 2019.

HURLEY, K. F.; et al. An outbreak of virulent systemic feline calicivirus disease. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v. 224, n. 2, p. 241-249, 2004. DOI: 10.2460/javma.2004.224.241. Disponível em: <https://avmajournals.avma.org/doi/abs/10.2460/javma.2004.224.241>. Acesso em: 24 out 2019.

ICTV, International Committee on Taxonomy of Viruses, 2018, Disponível em: <https://talk.ictvonline.org>. Acesso em : 20 out 2019.

JOHANN, J. M.; et al. Serum survey for antibodies to coronavirus, herpesvirus, calicivirus and parvovirus in domestic cats from Rio Grande do Sul, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 61, n. 3, p. 752-754, 2009. DOI: 10.1590/S0102-09352009000300033. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352009000300033. Acesso em: 05 nov 2019.

LARA, V. M.; et al. Molecular detection of infectious pathogens of the upper respiratory tract in captive nondomestic felids. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**. v. 48, n. 2, p. 529-531, 2017. DOI: 10.1638/2015-0290R2.1. Disponível em: <https://bioone.org/journals/Journal-of-Zoo-and-Wildlife-Medicine/volume-48/issue-2/2015-0290R2.1/MOLECULAR-DETECTION-OF-INFECTIOUS-PATHOGENS-OF-THE-UPPER-RESPIRATORY-TRACT/10.1638/2015-0290R2.1.short>. Acesso em: 04 nov 2019.

LYON, K. F. Gingivostomatitis. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**. v. 35, p. 891-911, 2005. DOI: 10.1016/j.cvsm.2005.02.001.

MAGGS, David J. Update on Pathogenesis, Diagnosis, and Treatment of Feline Herpesvirus Type 1. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**. v. 20, n. 4, p. 94-101, 2005. DOI: 10.1053/j.ctsap.2004.12.013. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0195561605000215?via%3Dihub>. Acesso em: 31 out 2019.

MARSILIO, F.; et al. A novel nested PCR for the diagnosis of calicivirus infections in the cat. **Veterinary Microbiology**. v. 105, n. 1, p. 1-7, 2005. DOI: 10.1016/j.vetmic.2004.09.017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113504003542?via%3Dihub>. Acesso em: 19 out 2019.

MELI, M. L.; et al. Molecular detection of feline calicivirus in clinical samples: A study comparing its detection by RT-qPCR directly from swabs and after virus isolation. **Journal of Virological Methods**. v. 251, p. 54-60, 2018. DOI: 10.1016/j.jviromet.2017.10.001. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0166093416307121?via%3Dihub>. Acesso em: 02 nov 2019.

MEYERS, G.; WIRBLICH, C.; THIEL, H. J. Rabbit hemorrhagic disease virus-molecular cloning and nucleotide sequencing of a calicivirus genome. **Virology**. v. 184, n. 2, p. 664-676, 1991. DOI: 10.1016/0042-6822(91)90436-f. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/004268229190436F>. Acesso em: 22 out 2019.

MCGEOCH, D. J.; RIXON, F. J.; DAVISON, A. J. Topics in herpesvirus genomics and evolution. **Virus Research**. v. 117, n. 1, p. 90-104, 2006. DOI: 10.1016/j.virusres.2006.01.002. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0168170206000219?via%3Dihub>. Acesso em: 30 out 2019.

MCGREGOR, G. F.; SHEEHAN, K.; SIMKO, E. Pneumonia and gastritis in a cat caused by feline herpesvirus-1. **The Canadian Veterinary Journal**. v. 57, n. 2, p. 147-150, 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4712990/>. Acesso em: 31 out 2019.

NAKANISHI, H.; et al. Prevalence of microorganisms associated with feline gingivostomatitis. **Journal of Feline Medicine and Surgery**. v. 21, n. 2, p. 103-108, 2018. DOI: 10.1177/1098612X18761274. Disponível em: https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1177/1098612X18761274?url_ver=Z39.88-

2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%3dpubmed. Acesso em: 31 out 2019.

NEILL, J.; BAUERMANN, F. V. *Caliciviridae* In: FLORES, E. F. (Org). **Virologia Veterinária: Virologia Geral e Doenças Víricas**. p. 637-646, 3ª ed., editora UFSM, Santa Maria, 2017.

NGUYEN, D.; et al. Feline upper respiratory tract infection and disease in Australia. **Journal of Feline Medicine and Surgery**. v. 21, n. 10, p. 973-978, 2018. DOI: 10.1177/1098612X18813248. Disponível em: https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1177/1098612X18813248?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%3dpubmed. Acesso em: 29 out 2019.

PEDERSEN, N. C.; et al. An isolated epizootic of hemorrhagic-like fever in cats caused by a novel and highly virulent strain of feline calicivirus. **Veterinary Microbiology**. v. 73, n. 4, p. 281-300, 2000. DOI: 10.1016/s0378-1135(00)00183-8. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113500001838?via%3Dihub>. Acesso em: 31 out 2019.

PEREIRA, J. J.; et al. Molecular characterization of feline calicivirus variants from multicat household and public animal shelter in Rio de Janeiro, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 49, n. 4, p. 777-784, 2018. DOI: 10.1016/j.bjm.2018.01.003. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6175694/>. Acesso em: 29 out 2019.

PESAVENTO, P.; CHANG, K-O.; PARKER, J. S. Molecular Virology of Feline Calicivirus. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**. v. 38, n. 4, p. 775-786, 2008. DOI: 10.1016/j.cvsm.2008.03.002. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0195561608000752?via%3Dihub>. Acesso em: 26 out 2019.

POVEY, C. R. A review of feline viral rhinotracheitis (feline herpesvirus I infection). **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**. v. 2, n. 2-3, p. 373-387, 1979. DOI: 10.1016/0147-9571(79)90023-7. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0147957179900237?via%3Dihub>. Acesso em: 02 nov 2019.

PORCELLATO, I.; et al. Feline herpesvirus ulcerative dermatitis: an atypical case? **Veterinary Dermatology**. v. 29, n. 3, p. 259-e96, 2018. DOI: 10.1111/vde.12537. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/vde.12537>. Acesso em: 28 out 2019.

RADFORD, A.; et al. High Genetic Diversity of the Immunodominant Region of the Feline Calicivirus Capsid Gene in Endemically Infected Cat Colonies. **Virus Genes**. v. 27, n. 2, p. 145-155, 2003. DOI: 10.1023/a:1025772409539. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1023%2FA%3A1025772409539>. Acesso em: 26 out 2019.

RADFORD, A.; et al. Feline calicivirus. **Veterinary Research**. v. 38, n. 2, p. 319-335, 2007. DOI: 10.1051/vetres:2006056. Disponível em: <http://publications.edpsciences.org/10.1051/vetres:2006056>. Acesso em: 26 out 2019.

RADFORD, A.; et al. Feline Calicivirus Infection: ABCD guidelines on prevention and management. **Journal of Feline Medicine and Surgery**. v. 11, n. 7, p. 555-564, 2009. DOI: 10.1016/j.jfms.2009.05.004. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1016/j.jfms.2009.05.004>. Acesso em: 02 nov 2019.

REYNOLDS, B. S.; et al. A nosocomial outbreak of feline calicivirus associated virulent systemic disease in France. **Journal of Feline Medicine and Surgery**. v. 11, n. 8, p. 633-644, 2009. DOI: 10.1016/j.jfms.2008.12.005. Disponível em: https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1016/j.jfms.2008.12.005?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%3dpubmed. Acesso em: 26 out 2019.

RODRIGUEZ, J. M. M.; et al. Alveolar macrophages are the main target cells in calicivirus-associated pneumonia. **The Veterinary Journal**. v. 201, n. 2, p. 156-165, 2014. DOI: 10.1016/j.tvjl.2014.04.022. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S109002331400183X?via%3Dihub>. Acesso em: 05 nov 2019.

RODRIGUEZ, J. M. M.; et al. Feline Herpesvirus Pneumonia: Investigations into the Pathogenesis. **Veterinary Pathology**. v. 54, n. 6, p. 922-932, 2017. DOI: 10.1177/0300985817720982. Disponível em: https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1177/0300985817720982?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%3dpubmed. Acesso em: 08 nov 2019.

BATISTA, H. B. C. R.; et al. Neutralizing antibodies against feline herpesvirus type 1 in captive wild felids of Brazil. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**. v. 36, n. 3, p. 447-450, 2005. DOI: 10.1638/04-060.1. Disponível em: <https://bioone.org/journals/journal-of-zoo-and-wildlife-medicine/volume-36/issue-3/04-060.1/NEUTRALIZING-ANTIBODIES-AGAINST-FELINE-HERPESVIRUS-TYPE-1-IN-CAPTIVE-WILD/10.1638/04-060.1.short>. Acesso em: 08 nov 2019.

SCHULZ, C.; et al. Sampling sites for detection of feline herpesvirus-1, feline calicivirus and *Chlamydia felis* in cats with feline upper respiratory tract disease. **Journal of Feline Medicine and Surgery**. v. 17, n. 12, p. 1012-1019, 2015. DOI: 10.1177/1098612X15569615. Disponível em: https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1177/1098612X15569615?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%3dpubmed. Acesso em: 04 nov 2019.

SCHORR-EVANS, E. M.; et al. An epizootic of highly virulent feline calicivirus disease in a hospital setting in New England. **Journal of Feline Medicine and Surgery**. v. 5, n. 4, p. 217-226, 2003. DOI: 10.1016/S1098-612X(03)00008-1. Disponível em: [https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1016/S1098-612X\(03\)00008](https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1016/S1098-612X(03)00008)

1?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%3dpubmed.
Acesso em: 29 out 2019.

SHELDON TAI, S. H.; et al. Complete genomic sequence and an infectious BAC clone of feline herpesvirus-1 (FeHV-1). **Virology**. v. 401, n. 2, p. 215-2017, 2010. DOI: 10.1016/j.virol.2010.02.021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0042682210001303?via%3Dihub>. Acesso em: 05 nov 2019.

SOSNOVTSEV, S. V.; et al. Feline calicivirus replication induces apoptosis in cultured cells. **Virus Research**. v. 94, n. 1, p. 1-10, 2003. DOI: 10.1016/s0168-1702(03)00115-1. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0168170203001151?via%3Dihub>. Acesso em: 28 out 2019.

STADEN, R. The Staden sequence analysis package. **Molecular Biotechnology**. v. 5, n. 3, p. 233-241, 1996. DOI: 10.1007/bf02900361. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF02900361>. Acesso em: 31 out 2019.

STILES, J. Feline Herpesvirus. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**. v. 18, n. 3. p. 178-185, 2003. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14604092-feline-herpesvirus/>. Acesso em: 26 out 2019.

STILES, J. POGRANICHNIY, R. Detection of virulent feline herpesvirus-1 in the corneas of clinically normal cats. **Journal of Feline Medicine and Surgery**. v. 10, n. 2, p. 154-159, 2008. DOI: 10.1016/j.jfms.2007.10.006. Disponível em: https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1016/j.jfms.2007.10.006?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%3dpubmed. Acesso em: 10 nov 2019.

STILES, J. Ocular manifestations of feline viral diseases. **The Veterinary Journal**. v. 201, n. 2, p. 166-173, 2014. DOI: 10.1016/j.tvjl.2013.11.018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1090023313006102?via%3Dihub>. Acesso em: 26 out 2019.

SYKES, J. E.; STUDDERT, V. P.; BROWING, G. F. Detection and strain differentiation of feline calicivirus in conjunctival swabs by RT-PCR of the hypervariable region of the capsid protein gene. **Archives of Virology**. v. 143, n. 7, p. 1321, 1334, 1998. DOI: 10.1007/s007050050378. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs007050050378>. Acesso em: 24 out 2019.

SYKES, J. E. Pediatric Feline Upper Respiratory Disease. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**. v. 44, n. 2, p. 331-342, 2014. DOI: 10.1016/j.cvsm.2013.10.005. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0195561613002222?via%3Dihub>. Acesso em: 24 out 2019.

- THIEL, H-J. J.; KÖNIG, M. Caliciviruses: an overview. **Veterinary Microbiology**. v. 69, n. 1-2, p. 55-62, 1999. DOI: 10.1016/s0378-1135(99)00088-7. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113599000887?via%3Dihub>. Acesso em: 02 nov 2019.
- THIRY, E.; et al. Feline Herpesvirus Infection: ABCD guidelines on prevention and management. **Journal of feline medicine and surgery**. v. 11, n. 7, p. 547-555, 2009. DOI: 10.1016/j.jfms.2009.05.003. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1016/j.jfms.2009.05.003>. Acesso em: 05 nov 2019.
- THOMAS, S.; et al. Prevalence of feline calicivirus in cats with odontoclastic resorptive lesions and chronic gingivostomatitis. **Research in Veterinary Science**. v. 111, p. 124-126, 2017. DOI: 10.1016/j.rvsc.2017.02.004. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0034528816301886?via%3Di> hub. Acesso em: 26 out 2019.
- TOWNSEND, W. M.; et al. Development of a reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay to detect feline herpesvirus-1 latency-associate transcripts in the trigeminal ganglia and corneas of cats that did not have clinical signs of ocular disease. **American Journal of Veterinary Research**. v. 65, n. 3, p. 314-319, 2004. DOI: 10.2460/ajvr.2004.65.314. Disponível em: <https://avmajournals.avma.org/doi/abs/10.2460/ajvr.2004.65.314>. Acesso em: 28 out 2019.
- TOWNSEND, W. M.; et al. Ocular and neural distribution of feline herpesvirus-1 during active and latent experimental infection in cats. **Veterinary Research**. v. 9, p. 1-9, 2013. DOI: 10.1186/1746-6148-9-185. Disponível em: <https://bmcvetres.biomedcentral.com/articles/10.1186/1746-6148-9-185>. Acesso em: 30 out 2019.
- WILLI, B.; et al. Molecular characterization and virus neutralization patterns of severe, non-epizootic forms of feline calicivirus infections resembling virulent systemic disease in cats in Switzerland and in Liechtenstein. **Veterinary Microbiology**, v. 182, p. 202-212, 2016. DOI: 10.1016/j.vetmic.2015.10.015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113515300559?via%3Dihub>. Acesso em: 29 out 2019.

Anexos

ANEXO A – Aprovação da Comissão de Ética e Experimentação Animal



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

PARECER Nº
PROCESSO Nº

8/2019/CEEA/REITORIA
23110.057742/2018-01

Certificado

Certificamos que a proposta intitulada **Frequência e caracterização molecular de herpesvirus felino tipo 1 (FeHV-1) e calicivirus felino (FCV) na cidade de Pelotas, RS**, processo nº 23110.05905657742/2018-01, sob a responsabilidade de Silvia de Oliveira Hubner que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 1 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e recebeu parecer **FAVORÁVEL** a sua execução pela Comissão de Ética em Experimentação Animal, em reunião de 10/12/2018.

| | |
|-------------------------|--|
| Finalidade | (X) Pesquisa () Ensino |
| Vigência da autorização | 02/01/2019 a 28/02/2020 |
| Espécie/linhagem/raça | Felinos |
| Nº de animais | 108 |
| Idade | Variável |
| Sexo | Ambos |
| Origem | Clínicas particulares e domicílios de Pelotas/RS |

Código para cadastro nº CEEA 57742-2018

M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix

Presidente da CEEA



Documento assinado eletronicamente por **ANELIZE DE OLIVEIRA CAMPELLO FELIX, Médico Veterinário**, em 28/03/2019, às 09:48, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufpel.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0480296** e o código CRC **CAE1B643**.