

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



Dissertação

**Identificação e caracterização molecular de coronavírus felino (FCoV)**  
**em gatos domésticos**

**Ana Carolina de Assis Scariot**

Pelotas, 2022

**Ana Carolina de Assis Scariot**

**Identificação e caracterização molecular de coronavírus felino (FCoV)  
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

Pelotas, 2022

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas Catalogação da  
Publicação

S285i Scariot, Ana Carolina de Assis

Identificação e caracterização molecular de coronavírus felino (FCoV)  
[recurso eletrônico] / Ana Carolina de Assis Scariot ; Silvia de  
Oliveira Hübner, orientadora. — Pelotas, 2022.  
51 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em  
Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de  
Pelotas, 2022.

Diagnósticos. 2. RT-PCR. 3. Peritonite Infeciosa Felina. I. Hübner,  
Silvia de Oliveira, orient. II. Título

CDD 636.8089692

Elaborada por Ubirajara Buddin Cruz CRB: 10/901

Ana Carolina de Assis Scariot

Identificação e caracterização molecular de coronavírus felino (FCoV)  
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: 29/04/2022

Banca examinadora:

Prof. Dr. Silvia de Oliveira Hübner (Orientador)  
Doutora em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Marcelo de Lima  
Doutor em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Dr. Rodrigo Casqueiro Cunha  
Doutor em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal do Mato Grosso do Sul

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Francielle Liz Monteiro  
Doutora em Ciência Animal pela Universidade Federal de Santa Maria

**A todos os gatos que acompanhei,  
especialmente, aos que tornaram este estudo possível.**

## **Agradecimentos**

Agradeço aos meus pais, por todo amor e amparo incondicional, que mesmo à distância, como bons ouvintes, me acompanharam escutando meus relatos de rotina, estudo e trabalho e me aconselharam diariamente. À minha família pelo apoio, principalmente nos momentos mais difíceis. Aos meus amigos por me ajudarem em cada desafio ao longo dessa jornada, além de me acompanharem nos experimentos e nos plantões. Ao meu amado avô, espero que onde estiver, se sinta orgulhoso.

À minha orientadora, Prof.<sup>a</sup> Dra. Silvia de Oliveira Hübner, pela compreensão e dedicação, por me acolher e acompanhar do início ao fim, superando todas as adversidades. A qual sempre serei imensamente grata.

Ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, a Capes e ao CNPq, pela oportunidade de realizar o mestrado acadêmico. A todos os meus professores, à Universidade Federal de Pelotas por todo o conhecimento transmitido e, especialmente, aos meus colegas do Laboratório de Virologia e Imunologia Veterinária pela contribuição na realização deste projeto.

Ao meu companheiro de quatro patas, Joey, minha maior motivação para ingressar na veterinária e o qual sempre será meu eterno amor. Aos meus gatos que, através de suas particularidades, despertaram minha paixão pela Medicina Felina.

E, principalmente, a todos os pacientes felinos por permitirem que este trabalho fosse realizado. Por tudo que aprendi nesta convivência que vai muito além da relação médico e paciente. Por me mostrarem que envolve também afeto, carinho e compreensão, de que toda vida é especial, valorizando suas características e individualidades.

A todos que fizeram parte desta etapa, minha eterna gratidão. Nada disto seria possível sem vocês.

*"I study these creatures. They are my teachers."*

— *Charles Bukowski*

*"I am always doing what I cannot do yet,  
in order to learn how to do it."*

— *Vincent Van Gogh*

## Resumo

SCARIOT, Ana Carolina de Assis. **Identificação e caracterização molecular de coronavírus felino (FCoV) em gatos domésticos**. 2022.70 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2022.

O coronavírus felino (FCoV) é um dos principais agentes virais que infecta membros da espécie *Felidae*, tanto felinos domésticos quanto selvagens, considerado muito disseminado na população de gatos domésticos. O FCoV é classificado em dois biótipos, o coronavírus entérico felino (FECV) e o vírus da peritonite infecciosa felina (FIPV), causador da Peritonite Infecciosa Felina (PIF), uma doença grave e, geralmente, fatal. É descrito que algumas alterações no genoma do FCoV podem ser marcadores que permitem a diferenciação entre FECV e FIPV. Algumas substituições de aminoácidos, na região da glicoproteína *spike* (S), como as mutações M1058L e S1060A, são postuladas como possíveis marcadores, embora ainda não exista consenso sobre o assunto. Além disso, são escassos os dados sobre análises moleculares de FCoV no Brasil. O presente estudo teve por objetivos a detecção de FCoV em populações de gatos domésticos com e sem sinais clínicos relacionados à infecção por FCoV e/ou PIF e posterior análise com relação a substituições de aminoácidos, na região da glicoproteína *spike* (S). Na parte inicial é apresentada uma revisão bibliográfica a respeito das análises moleculares de FCoV, explorando tópicos a respeito da detecção viral, da análise filogenética e de possíveis marcadores que diferenciem FECV de FIPV. Na segunda parte são apresentados dados da pesquisa referente à identificação e ocorrência de FCoV em Pelotas - RS/Brasil, em felinos domésticos. *Swabs* retais, amostras de órgãos de necropsia, sangue e/ou líquidos de efusões foram coletados de 77 gatos, totalizando 90 amostras coletadas. Destas amostras, revelando 26% de gatos positivos, através da reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa (RT-PCR), sendo 11 deles com sinais entéricos, 4 com sinais de FIP e 5 assintomáticos. De 9 cepas (5 FECV e 4 FIPV) sequenciadas e analisadas para as mutações M1058L e S1060A, apenas uma cepa de FIPV continha a mutação M10580L e nenhuma continha a mutação S1060A anteriormente relatada. O presente trabalho apresenta contribuições para o conhecimento da epidemiologia do FCoV na região.

**Palavras-chave:** diagnósticos, Peritonite Infecciosa Felina, RT-PCR.



## Abstract

SCARIOT, Ana Carolina de Assis. ***Identification and molecular characterization of feline coronavirus (FCoV) in domestic cats***. 2022. 70 f. Dissertation (Master's in Veterinary Science) - Postgraduate Program in Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Federal University of Pelotas, Pelotas, 2022.

The feline coronavirus (FCoV) is one of the main viral agents that infects members of the Felidae species, both domestic and wild felines, considered very widespread in the domestic cat population. FCoV is classified into two biotypes, the feline enteric coronavirus (FECV) and the feline infectious peritonitis virus (FIPV), which causes feline infectious peritonitis (FIP), a serious and usually fatal disease. It is described that some alterations in the FCoV genome may be markers that allow the differentiation between FECV and FIPV. Some amino acid substitutions in the spike glycoprotein (S) region, such as the M1058L and S1060A mutations, are postulated as possible markers, although there is still no consensus on the subject. In addition, data on molecular analyzes of FCoV in Brazil are scarce. The present study aimed to detect FCoV in populations of domestic cats with and without clinical signs related to FCoV and/or FIP infection and further analysis regarding amino acid substitutions in the spike glycoprotein (S) region. In the initial part, a literature review is presented regarding the molecular analysis of FCoV, exploring topics regarding viral detection, phylogenetic analysis, and possible markers that differentiate FECV from FIPV. In the second part, research data concerning the identification and occurrence of FCoV in Pelotas - RS/Brazil, in domestic felines are presented. Rectal swabs, necropsy organ samples, blood and/or effusion fluids were collected from 77 cats, totaling 90 samples collected. These samples revealed 26% of positive cats, through reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR), with 11 of them showing enteric signs, 4 showing FIP signs and 5 asymptomatic. Of 9 strains (5 FECV and 4 FIPV) sequenced and confirmed for the M1058L and S1060A mutations, only one FIPV strain contained the M10580L mutation and none contained the previously reported S1060A mutation. The present work presents contributions to the knowledge of the epidemiology of FCoV in the region.

**Keywords:** diagnostics, Feline Infectious Peritonitis, RT-PCR.

## **Lista de Figuras**

Figura 1	Representação estrutural do FCoV.....	19
Figura 2	Representação genômica do FCoV.....	20

## Lista de Abreviaturas e Siglas

AAFP	<i>American Association of Feline Practitioners</i>
bP	Pares de Bases
cDNA	DNA complementar
DNA	Ácido Dexorriboucléico
EDTA	Ácido Dietilamino Tetra Acético
ELISA	Ensaio Imunoenzimático
fAPN	Aminopeptidase-N
FCoV	Coronavírus Felino
FECV	Coronavírus Entérico Felino
FeLV	Leucemia Viral Felina
FIPV	Vírus da Peritonite Infecciosa Felina
FIV	Imunodeficiência Viral Felina
IHC	Imuno-histoquímica
IMC	Imunidade Celular Mediada Por Células
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
mRNA	RNA Mensageiro
ORF	<i>Open Reading Frame</i> ou Fase Aberta de Leitura
PIF	Peritonite Infecciosa Felina
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
RT-qPCR	Reação em Cadeia de Polimerase por Transcrição Reversa em Tempo Real

RNA	Ácido Ribonucleico
RT-PCR	Reação em Cadeia de Polimerase por Transcrição Reversa
RS	Rio Grande do Sul
SNP	Polimorfismo de Nucleotídeo Único
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral
UFPEl	Universidade Federal de Pelotas
$\mu$ L	Microlitro
V	Volt

## Lista de Símbolos

$\alpha$	Alfa
$<$	Menor
$>$	Maior
$\%$	Porcentagem
$\text{\textcircled{R}}$	<i>Registered Symbol</i>

## Sumário

<b>1 Introdução.....</b>	<b>14</b>
<b>2 Revisão de Literatura .....</b>	<b>16</b>
<b>2.1 Etiologia .....</b>	<b>16</b>
<b>2.1.1. Replicação viral. ....</b>	<b>19</b>
<b>2.1.2 Biótipos .....</b>	<b>20</b>
<b>2.1.3 Sorotipos.....</b>	<b>20</b>
<b>2.2 Epidemiologia .....</b>	<b>21</b>
<b>2.3 Patogenia .....</b>	<b>22</b>
<b>2.4 Sinais clínicos .....</b>	<b>23</b>
<b>2.5 Diagnóstico da PIF .....</b>	<b>24</b>
<b>2.5.1 Reação em cadeia de polimerase por transcriptase reversa (RT-PCR) e reação em cadeia de polimerase por transcrição reversa em tempo real (qRT- PCR) .....</b>	<b>25</b>
<b>2.5.2 Marcadores moleculares .....</b>	<b>25</b>
<b>2.6 Tratamento e prevenção .....</b>	<b>29</b>
<b>3 Artigo.....</b>	<b>31</b>
<b>4 Considerações Finais.....</b>	<b>38</b>
<b>Referências .....</b>	<b>39</b>
<b>Anexos .....</b>	<b>48</b>

## 1 Introdução

Os coronavírus são vírus pertencentes a família *Coronaviridae* e capazes de infectar humanos, outros mamíferos e espécies aviárias, geralmente causando doenças intestinais, respiratórias, neurológicas ou sistêmicas. Com base em análises comparativas de sequências genômicas, os coronavírus são subdivididos em quatro gêneros: *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus* e *Deltacoronavirus*, dentro da subfamília *Orthocoronavirinae* (ICTV, 2021). O coronavírus felino (FCoV) pertence aos *alfacoronavírus* e é um agente viral complexo, responsável por causar uma das mais importantes doenças infecciosas que acometem felinos domésticos e selvagens, a Peritonite Infecciosa Felina (PIF), que é uma enfermidade imunomediada, sistêmica, progressiva e fatal (HARTMANN, 2005).

A PIF foi descoberta na década de 1960 e desde então já foram relatados diversos casos da doença ao redor do mundo, tanto em gatos domésticos quanto silvestres, como guepardos (*Acinonyx jubatus*), tigres (*Panthera tigris*), leões-da-montanha (*Puma concolor*) e leões (*Panthera leo*) (STOUT et al., 2021). O FCoV ocorre em dois biótipos distintos, de acordo com a patogenicidade: o coronavírus entérico felino (FECV) e o vírus da peritonite infecciosa felina (FIPV). O FCoV é altamente contagioso e a infecção é comum nas populações de felinos domésticos (PEDERSEN, 2014).

A transformação do FECV para FIPV ainda não é totalmente compreendida, entretanto acredita-se que determinadas mutações no genoma viral possam atuar como marcadores que levam o desenvolvimento do FECV para o FIPV (CHANG et al., 2012). Embora, diversos estudos tentem elucidar essa questão, a PIF continua sendo uma doença de difícil diagnóstico. No Brasil, a maioria dos estudos realizados são inquéritos epidemiológicos baseados em testes sorológicos para anticorpos contra FCoV. Trabalhos sobre a detecção e caracterização molecular de FCoV em gatos domésticos ainda são escassos, não existindo nenhum estudo realizado na região Sul do Brasil com essa temática.

O presente estudo teve como objetivo geral identificar e avaliar a ocorrência de FCoV em gatos domésticos sintomáticos e assintomáticos no município de Pelotas (Rio Grande do Sul, Brasil) através de uma pesquisa qualitativa com a utilização de técnicas de biologia molecular. Como objetivos específicos, a presente dissertação visou a identificação e caracterização molecular de amostras de FCoV, por meio de reação em cadeia de polimerase via transcriptase reversa (RT-PCR), sequenciamento do gene da glicoproteína *spike*, análise filogenética das amostras de FCoV encontradas e comparação de resultados com outros estudos. A dissertação é composta pelo estudo sob a forma de uma revisão bibliográfica e de um artigo científico intitulado:

- Mutation analysis of the spike protein in domestic cats infected with feline coronavirus with or without clinical signs relative to feline infectious peritonitis.



## 2 Revisão de Literatura

### 2.1 Etiologia

O coronavírus felino é um vírus RNA de fita simples e sentido positivo (ssRNA +), envelopado, pertencente à família *Coronaviridae*, ordem *Nidovirales*, subfamília *Orthocoronavirinae*, gênero *Alphacoronavirus* e espécie *Alphacoronavirus 1* (ICTV, 2021). A classificação do FCoV é baseada na sequência completa do genoma viral e no gene ORF1ab conservado (JAIMES et al., 2020).

A estrutura genômica do FCoV (Figura 1) é semelhante a de outros coronavírus e apresenta aproximadamente 29.000 nucleotídeos (PEDERSEN et al., 2009). O envelope viral apresenta longas espículas que dão à partícula viral um aspecto típico de coroa, de onde deriva o nome da família. O FCoV possui um complexo mecanismo de replicação viral, que inclui a produção de RNAs mensageiros (mRNAs) subgenômicos por um processo de transcrição descontínuo (MILLER; KOEV, 2000; VAN VLIET et al., 2002). Essa forma de replicação resulta em uma alta frequência de recombinações, levando a novas cepas (GRIBBLE et al., 2021). Por esse motivo, muitos coronavírus apresentam uma grande variação antigênica, com a existência de vários sorotipos circulantes (LOVATO; DEZENGRINI, 2017). Segundo estudos, o FCoV tipo II se originou da recombinação entre o vírus felino (FCoV tipo I) e o coronavírus canino (CCoV) (HERREWEGH et al., 1998). O que corrobora com a teoria de que a alta frequência de recombinação, assim como, as deleções do genoma viral podem estar ligadas com o surgimento de cepas mais virulentas do coronavírus felino (CHANG et al., 2012; LOVATO; DEZENGRINI, 2017).

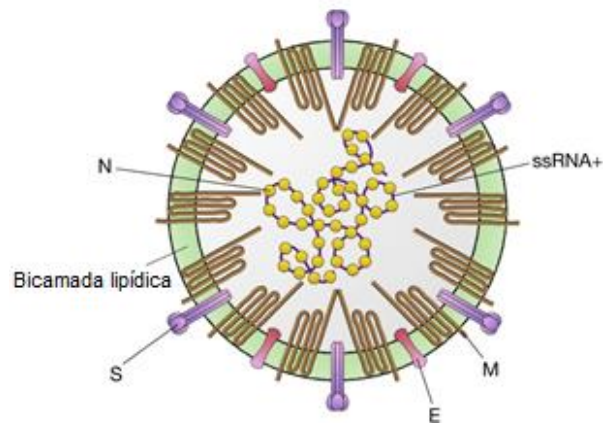
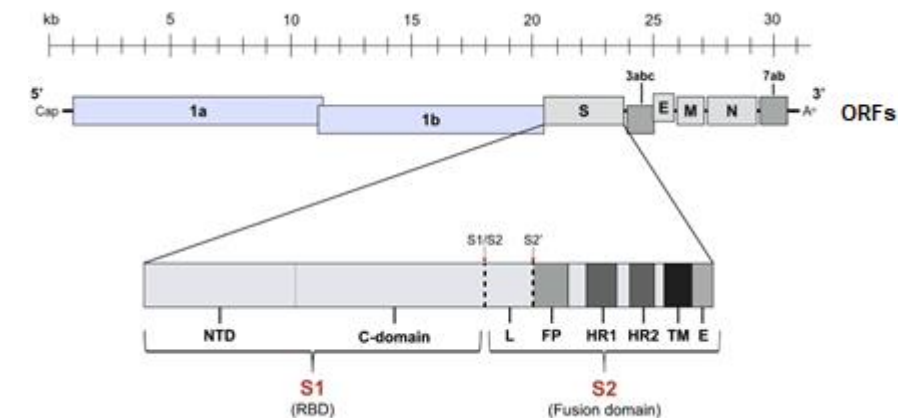


Figura 1 Representação estrutural do FCoV. Adaptado de Jaimes; Whittaker (2018)

O genoma viral do FCoV (Figura 2) é composto por 11 ORFs (*open reading frames* ou fases de leitura aberta), incluindo uma replicase não-estrutural relacionada a dois grandes ORFs (PEDERSEN et al., 2009). O ORF1 codifica mais de 10 proteínas individuais necessárias para a replicação do vírus. Em seguida, encontra-se o gene que codifica a principal proteína do envelope viral, a proteína *spike* (S), a qual possui a função de ligação do vírus à célula-alvo, indução de anticorpos neutralizantes e desencadeamento da imunidade mediada por células (ROTTIER et al., 2005; JAIMES; WHITTAKER, 2018). A região S possui dois domínios, o domínio S1 da proteína S é responsável pelo receptor de ligação e o domínio S2 que é necessário para a fusão das membranas virais e celulares (BOSCH et al., 2003). Essa porção do genoma é seguida por diversas ORFs que codificam proteínas não estruturais de funções ainda não identificadas, incluindo os ORFs 3a-c.

O gene M codifica a proteína de membrana, uma pequena proteína estrutural, que interage com o envelope e com o núcleo do vírus. Além disso, a proteína da membrana também interage com a imunidade mediada por células do hospedeiro e também tem função de induzir a síntese de interferon e a apoptose celular (ZHAO et al., 2006). O gene E codifica a proteína do envelope viral, a qual também interage com a proteína de membrana e atua na estruturação viral. O gene N codifica a proteína do capsômero, que recobre o ácido nucleico em um núcleo helicoidal. Além disso, a proteína N possui dois domínios que interagem com o mRNA subgenômico, permitindo a replicação viral (KIPAR; MELI, 2014).



9

Figura 2 Organização genômica do FCoV. Representação esquemática do genoma do FCoV, com as *open reading frames* (ORFs), genes e domínios do gene *spike*. Adaptado de Jaimes; Whittaker (2018)

Os FCoVs também possuem os ORFs 7a e 7b que codificam proteínas não estruturais de função desconhecida (TEKES; THIEL, 2016). E cinco genes acessórios chamados 3a, 3b, 3c, 7a e 7b. Entre os genes S e E estão presentes três ORFs (3a, 3b e 3c). Deleções nas regiões do ORF 3 e 7 mostraram que os genes acessórios são dispensáveis para o crescimento viral *in vitro*, mas foram sugeridos como importantes para a replicação do vírus e a virulência *in vivo* (HAJEMA; VOLDERS; ROTTIER, 2004). No entanto, as funções das proteínas acessórias ainda não estão completamente estabelecidas.

### 2.1.1. Replicação viral

Os coronavírus apresentam um complexo mecanismo de replicação viral, que inclui a produção de RNAs mensageiros (mRNA) subgenômicos (LOVATO; DEZENGRINI, 2017). Essa forma de replicação resulta em uma alta frequência de recombinações e, por isso, muitos desses vírus apresentam uma grande variação

antigênica, com a existência de vários sorotipos circulantes (LOVATO; DEZENGRINI, 2017).

A replicação dos coronavírus começa quando o vírus se liga à membrana da célula hospedeira por meio da proteína S, fundindo seu envelope com a membrana celular. Em seguida, o material genético do vírus é liberado no citoplasma. O primeiro gene (pol) é traduzido em uma poliproteína que origina a replicase viral e outras enzimas importantes para a reprodução do RNA. A enzima polimerase usa o RNA do vírus como molde para produzir uma cópia negativa, a partir da qual são gerados novos genomas virais e mRNAs subgenômicos. Esses mRNAs codificam as proteínas necessárias para formar novos vírus. Apenas a primeira sequência (ORF) próxima da extremidade 5' é traduzida, e todos os mRNAs subgenômicos têm uma sequência líder comum. As proteínas produzidas passam por modificações, como fosforilação ou glicosilação. A montagem dos novos vírions ocorre em uma região entre o retículo endoplasmático e o complexo de Golgi. Depois, eles são levados em vesículas até a membrana da célula e liberados por exocitose. (LOVATO; DEZENGRINI, 2017).

### **2.1.2 Biótipos**

O FCoV existe em dois biótipos diferentes, o FECV e o FIPV. Os biótipos são descritos como grupos de vírus com a mesma constituição genética, porém possuem diferenças na indução de alterações microscópicas visíveis (vacuolização e lise) em cultivos celulares *in vitro* (KELLING, 1996). O FECV, geralmente, causa enterite leve, cursando com uma infecção subclínica e autolimitante (CAMERO et al., 2022; PEDERSEN et al., 2009). Além disso, é altamente prevalente em ambientes com vários gatos e muito contagioso (FELTEN; HARTMANN, 2019).

Em contrapartida, o FIPV ocorre em cerca de 5 a 10% dos gatos infectados e causa a PIF, uma doença, geralmente, fatal (FELTEN; HARTMANN, 2019). A principal teoria para os diferentes biótipos é de que o FIPV se originaria do FECV através de mutações ocorridas em um animal persistentemente infectado (LICITRA et al., 2013),

entretanto, até o momento, a mutação exata que determina o biótipo FIPV ainda é desconhecida (LICITRA et al., 2013).

Uma hipótese alternativa apontada é de que existam cepas de FCoV virulentas e avirulentas, sugerindo que cepas apatogênicas ou patogênicas distintas de FECV circulem nas populações de gatos domésticos e que a doença se desenvolveria apenas nos gatos infectados pelas cepas virulentas (BROWN et al, 2009; JAIMES et al., 2020).

### 2.1.3 Sorotipos

São descritos dois sorotipos distintos do FCoV, com base em diferenças antigênicas, os sorotipos I e II, os quais existem em ambos os biótipos (FECV e FIPV). A maioria das infecções naturais por FCoV são do sorotipo I, sendo responsável por, aproximadamente, 90% das infecções naturais por FCoV (ADDIE et al., 2003), enquanto o sorotipo II é menos frequente e mais relacionado antigenicamente ao coronavírus entérico canino (VENNEMA et al., 1998). É teorizado que os FCoVs tipo II sejam um resultado de uma recombinação entre FCoV tipo I e coronavírus entérico canino, especificamente no gene da glicoproteína *spike* (KENEDY, 2020).

A presença de diferenças no gene S entre os dois sorotipos é refletida por diferentes características de crescimento *in vitro* (DYE; SIDDELL, 2007). As características distintas presentes no gene S resultam em uma diferença para os receptores celulares aos quais ocorre a ligação do FCoV. No sorotipo II a aminopeptidase N felina (fAPN) foi identificada como o receptor celular de ligação, enquanto o receptor para FCoV tipo I ainda não foi identificado (JAIMES et al., 2020).

Em estudos, foi demonstrado que FCoVs tipo I induziam títulos de anticorpos mais elevados que FCoVs tipo II e estavam mais frequentemente associados a sinais clínicos e /ou PIF (KUMMROW et al., 2005). Em adição, existem interfaces para ativar o peptídeo de fusão presentes entre os domínios S1 e S2 no FCoV do tipo I, mas ausentes no tipo II, que sugerem uma diferença nos mecanismos moleculares utilizados pelos dois tipos desse vírus para entrar na célula e podem ser possíveis

explicações para a maior prevalência do FCoV tipo I na população de gatos (JAIMES et al., 2020).

## **2.2 Epidemiologia**

O FCoV é um vírus extremamente contagioso e a infecção é considerada frequente nas populações de felinos domésticos em todo o mundo. Estima-se, através de estudos sorológicos, que os anticorpos estejam presentes em cerca de 80 a 90% dos gatos que vivem em abrigos e em 30 a 50% dos gatos domiciliados (PEDERSEN, 2014). Em estudo realizado na região sudeste do Brasil, foi identificada soropositividade de 64,2% (97/151) dos gatos domésticos avaliados (ALMEIDA et al., 2019). Especificamente em Pelotas - RS, foi realizado um inquérito sorológico que determinou a ocorrência da infecção por FCoV, através do teste de soro-neutralização. Neste estudo foram detectados anticorpos para o vírus em 75,2% (73/97) dos gatos avaliados, sugerindo alta exposição ao FCoV na população de gatos na área estudada (JOHANN et al., 2009). Entretanto, ainda são escassos os dados sobre ocorrência e distribuição do FCoV na população felina no Brasil (LOVATO; DEZENGRINI, 2017).

A ocorrência de PIF é mais frequente em gatos jovens entre três meses e três anos de idade (ADDIE et al., 2012). No entanto, gatos com mais idade também podem desenvolver PIF, principalmente quando expostos a altas cargas virais e/ou devido ao declínio na resposta imunológica. Os casos de PIF são mais prevalentes em ambientes com alta concentração felina, como abrigos e gatis, onde maiores taxas de infecção viral e disseminação de variantes de FIPV expõem os animais a doses infectantes significativas (FOLEY et al., 1997). Apesar da grande prevalência de FCoV na população felina, cerca de 5 a 10% dos gatos soropositivos apresentam sinais clínicos e, conseqüentemente, desenvolvem a PIF (ADDIE et al., 2012).

O FCoV pode causar infecções persistentes com eliminação, muitas vezes, intermitente nas fezes. Em ambientes com grande proporção de gatos, os animais podem sofrer ciclos de infecção e excreção do vírus, recuperação e reinfecção (HARTMANN, 2005). Ademais, estudos demonstraram que gatos podem excretar

FECV nas fezes, mesmo enquanto clinicamente assintomáticos. Sendo assim, gatos assintomáticos que excretam o vírus nas fezes de forma persistentes ou intermitente representam uma fonte importante de infecção (BUBENIKOVA et al., 2020).

### **2.3 Patogenia**

As diferenças no tropismo celular podem explicar as manifestações clínicas da infecção por FCoV serem diversas das desencadeadas pela PIF. A patogênese que leva ao desenvolvimento da PIF ainda não é totalmente compreendida, mas a principal teoria é de que ocorreria uma ou mais mutações em genes específicos, levando ao desenvolvimento da PIF. Apesar de alguns genes serem considerados prováveis responsáveis, ainda não foi esclarecido quais os fatores determinantes para a ocorrência mutações (ADDIE et al., 2003).

O FECV apresenta tropismo pelo epitélio das microvilosidades intestinais (PEDERSEN et al., 2009), replicando-se nos enterócitos e causando, geralmente, diarreia ou infecção assintomática, enquanto FIPV possui tropismo e replica-se com eficiência em macrófagos e monócitos, ocasionando infecção sistêmica (ROTTIER et al., 2005). A disseminação linfática do FIPV permite uma viremia com novas replicações e acúmulos no endotélio das veias e capilares, o qual induz uma resposta imune, objetivando eliminar o vírus. Este processo resulta em resposta inflamatória intensa e, posteriormente, em vasculite piogranulomatosa sistêmica, na qual macrófagos infectados e complexos antígeno-anticorpo são depositados no endotélio capilar estabelecendo uma inflamação perivascular e produzindo uma efusão peritoneal e pleural, de intensidade variada (ECHETO et al., 2005).

Dessa forma, a PIF é caracterizada como uma enfermidade imunomediada e progressiva, que leva ao desenvolvimento de vasculite imunomediada e acomete diversos órgãos (HARTMANN, 2005). Fatores do hospedeiro reconhecidos por contribuir para a incidência de PIF incluem características do complexo de histocompatibilidade principal (MHC), produção exacerbada de citocinas e fraca resposta imune mediada por células (CMI) (ZADRA, 2013; KENEDY, 2020).

## 2.4 Sinais clínicos

A principal alteração clínica da infecção por coronavírus entérico é diarreia autolimitante, mas ocasionalmente pode ocorrer um curso agudo ou crônico mais grave de vômitos, diarreia e perda de peso. Raramente, as infecções entéricas por FCoV são graves ou fatais (KIPAR et al., 1998). Já os sinais clínicos da PIF são inespecíficos e podem ser muito variáveis, pois, diversos órgãos podem ser acometidos, como intestino, linfonodos, baço, fígado, rins, pulmão, coração, além da possibilidade de sinais oftálmicos e neurológicos (HARTMANN, 2005). As alterações mais frequentes são anorexia, caquexia, icterícia, letargia, pirexia crônica, prostração. A PIF pode ocorrer de duas formas diferentes, a forma efusiva da doença (também chamada de úmida), na qual onde o principal sintoma é o acúmulo de líquidos em cavidades, podendo esses serem pleurais, peritoneais e/ou pericárdicos. Uma segunda forma da doença é descrita como não efusiva (ou PIF seca), na qual há ausência de acúmulo de líquidos nas cavidades. Podendo ainda, durante a progressão da doença, o animal manifestar as duas formas de apresentação doença (HARTMANN, 2005).

Assim como os sinais clínicos, as anormalidades clínico-patológicas da PIF também são inespecíficas. Alterações que podem estar presentes no hemograma incluem anemia normocítica normocrômica, microcitose sem anemia e anemia hemolítica imunomediada (FELTEN, HARTMANN, 2019). Leucocitose e linfopenia podem estar presentes, principalmente nos estágios terminais pois, o grau de linfopenia está correlacionado com a progressão da doença. Um maior grau, assim como, a precocidade da linfopenia, aparentam estar interligados ao aumento da gravidade e progressão da enfermidade. Um dos fatores que levaria à essa alteração, é a secreção de fator tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) causando à apoptose de linfócitos (TAKANO et al., 2007). As alterações nos parâmetros bioquímicos séricos refletem o órgão ou órgãos envolvidos. Na bioquímica sérica, normalmente a quantidade proteína total está elevada enquanto g-globulinas estão aumentadas, resultando numa razão albumina/globulina diminuída (A:G) (ADDIE et al., 2009). A maioria dos gatos



com PIF tem bilirrubinemia e bilirrubinúria. Este aumento dos níveis de bilirrubina é devido à destruição dos glóbulos vermelhos e acúmulo de hemoglobina que muitas vezes acompanha a PIF (PEDERSEN, 2014).

As efusões de PIF geralmente possuem características visuais de um líquido amarelado, moderadamente viscoso e com turbidez, possuindo alto teor de proteína (próximo ao nível sérico ou superior) (PEDERSEN, 2014). Os líquidos são caracterizados, geralmente, como transudatos modificados ou exsudatos não sépticos, com base na ausência ou escassa presença de celularidade (ZOIA et al., 2009).

## **2.5 Diagnóstico da PIF**

A PIF é geralmente diagnosticada clinicamente após o desenvolvimento de derrames na cavidade abdominal e, menos frequentemente, na cavidade pleural e/ou com a formação de granulomas em órgãos (KIPAR et al., 2005). As análises hematológicas e bioquímicas de sangue, assim como, de efusão, citologia e cultura bacteriana, embora não sejam específicas para a PIF, são importantes, quando interpretadas em conjunto com a clínica, para a suspeita de PIF e excluir possíveis diagnósticos diferenciais (HARTMANN et al., 2003; FISCHER et al, 2012).

A infecção por FCoV leva à produção de anticorpos, sendo detectáveis a partir de sete dias da infecção, entretanto, os testes sorológicos não diferenciam anticorpos contra FECV e FIPV. Sendo assim, a presença de altos títulos de anticorpos no sangue não pode ser utilizada como indicador específico para PIF (PEDERSEN et al., 2009). Há diversas técnicas que podem ser aplicadas para o diagnóstico da PIF, quando analisados em conjunto aos sinais clínicos e exames complementares (hematológicos, bioquímicos, ultrassonografia e radiografia), como o teste de Rivalta, eletroforese de proteínas dos fluidos cavitários, imunocitoquímica, exames sorológicos (imunofluorescência e ELISA) e testes moleculares, como a reação em cadeia de polimerase via transcrição reversa (RT-PCR) e a reação em cadeia de polimerase via transcrição reversa em tempo real (RT-qPCR) (KENEDY, 2020).

Uma necropsia completa com exame histopatológico adequado de tecidos doentes pode ser uma maneira precisa de confirmar um diagnóstico. No entanto, como com outros aspectos desta doença, muitas vezes, existe uma dificuldade em atribuir o diagnóstico definitivo à PIF (PEDERSEN, 2014). A análise considerada padrão ouro para diagnóstico da PIF é a imuno-histoquímica (IHC) em macrófagos. A especificidade da IHC é estimada em cerca de 100% em órgãos que possuem lesões histológicas compatíveis com PIF (STRANIERI et al., 2020).

Entretanto, a IHC, geralmente, só pode ser realizada na necropsia, devido ao risco de realizar uma laparotomia ou laparoscopia no paciente enfermo, além da necessidade de coletar amostras de diferentes órgãos, pois, o antígeno FCoV pode estar variavelmente distribuído. Por isto, e por ser uma técnica invasiva, a realização de IHC é invasiva e arriscada para o diagnóstico *ante mortem* (LONGSTAFF et al., 2017; RISSI, 2018).

### **2.5.1 Reação em cadeia de polimerase por transcriptase reversa (RT-PCR) e reação em cadeia de polimerase por transcrição reversa em tempo real (RT-qPCR)**

Um dos métodos mais frequentes de identificação e diagnóstico viral é a RT-PCR (STRANIERI et al., 2020), ainda mais devido à dificuldade da realização da IHC *ante mortem* (LONGSTAFF et al., 2017; RISSI, 2018). A RT-PCR e a RT-qPCR são ensaios extremamente úteis para a detecção e quantificação, respectivamente, de RNA viral em tecidos com lesões ou derrames cavitários, podendo demonstrar a disseminação sistêmica e a presença do vírus em locais extra intestinais (PEDERSEN, 2014). A utilização de amostras de efusão demonstrou que a detecção de RNA de FCoV por RT-qPCR de FCoV foi altamente específica, não havendo resultados positivos em gatos que não tinham PIF (LONGSTAFF et al., 2017). No entanto, a sensibilidade foi de 85%, dessa forma resultados falsos negativos são possíveis (LONGSTAFF et al., 2017; KENEDY, 2020). De forma semelhante, em estudo realizado com RT-qPCR do líquido cefalorraquidiano em gatos com PIF

neuroológica e/ou ocular em comparação a gatos sem PIF, foram relatadas uma especificidade de 100% e sensibilidade de 85,7% para a PIF (DYE; SIDDELL, 2007).

Encontrar quantidades significativas de RNA viral em sangue, derrame, ou tecido de gatos sintomáticos indica a presença do FCoV e pode ser um indicativo de PIF (SIMONS et al., 2005). Em um estudo, em 46% dos casos com suspeita clínica de PIF e em 93% dos animais positivos para PIF na avaliação histopatológica foi detectado RNA viral (HORA, 2014). A carga viral no diagnóstico tem emergido como um indicador importante da gravidade da doença (STRANIERI et al., 2020). Além disso, o fluido efusivo continua a ser o substrato de escolha para as análises, que está ausente na forma não efusiva da doença (DRECHSLER et al., 2011).

O teste fecal para FCoV por RT-PCR ou RT-qPCR é uma alternativa para detectar excreção viral. Além disso, é possível quantificar o nível e a frequência da excreção do FCoV nas fezes, auxiliando na identificação de possíveis gatos transmissores assintomáticos e ajudando na definição de práticas para prevenir a infecção (FELTMAN; HARTMANN, 2019). Embora os gatos com PIF possam excretar vírus nas fezes, o vírus geralmente é excretado em níveis mais baixos do que em gatos assintomáticos, além disso, o vírus excretado nesses casos é considerado do biótipo FECV e não do biótipo FIPV, não sendo útil para diagnóstico da PIF (PEDERSEN et al., 2009, 2012; CHANG et al., 2010, 2012).

### **2.5.2 Marcadores moleculares**

Mutações no genoma do FECV e substituições de aminoácidos nas proteínas codificadas, ainda não totalmente identificadas, são consideradas possíveis marcadores da transformação de FECV para FIPV e, conseqüentemente, do desenvolvimento de PIF (CHANG et al., 2010; PEDERSEN et al., 2009). As mutações também levariam a uma maior virulência do coronavírus felino (KENEDY, 2020). Foram reconhecidas deleções nos genes específicos do grupo 3c, 7b (VENNEMA et al., 1998) 7a (KENNEDY et al., 2001), mutações pontuais na região *spike* (ROTTIER et al., 2005), e no gene da proteína de membrana (M) (BROWN et al., 2009). Outro estudo concluiu que as mutações no gene M e a homologia do FCoV entérico e

sistêmico corroboram a teoria de que a mutação *in vivo* de cepas virulentas leva à PIF (HORA et al., 2019).

Também foi descrito que duas substituições de aminoácidos, M1058L e S1060A, dentro da proteína *spike* (S), que codifica o peptídeo de fusão, foram associadas à mudança de virulência FECV para FIPV (CHANG et al., 2012). Em estudos, foi aferido que a substituição M1058L era indicativa de disseminação sistêmica do FCoV (DECARO et al., 2021). A maioria das cepas de FCoV, analisadas no estudo de Longstaff et al. (2017) apresentaram alterações nestas sequências de aminoácidos previamente associados à disseminação sistêmica ou virulência do vírus da PIF.

Também foram identificadas mutações nas proximidades dos nucleotídeos 23531 e 23537 do gene S, causando duas substituições de aminoácidos diferentes na proteína S. Em contraste com outras mutações do gene S, um total de quatorze mutações no nucleotídeo 23531 e 23537 foram identificadas em 96% das cepas de FCoV isoladas de gatos com PIF neste estudo. Essas mutações não foram identificadas em amostras fecais de gatos controle clinicamente saudáveis (EMMLER et al., 2020).

O gene 3c está presente de forma íntegra na maioria das cepas obtidas de gatos com PIF e é um dos genes mais estudados (BANK-WOLF et al., 2014). Em estudo, todos os isolados fecais de FCoV possuíam um gene 3c intacto, sugerindo que um gene 3c intacto seja necessário para a replicação intestinal do FCoV (HORA et al., 2016). Dessa forma, é considerado que deleções no gene 3c possam atuar como possíveis marcadores capazes de distinguir os biótipos de FCoV. Mutações que afetam a expressão da proteína 3c contribuem para um aumento da replicação viral em monócitos e macrófagos e, assim, ao desenvolvimento de PIF (TEKES; THIEL, 2016). Mutações e deleções na proteína 3c foram associadas à disseminação sistêmica do vírus (RIEMER et al., 2016) e perda da capacidade de replicação nas células epiteliais intestinais (KENNEDY, 2020). No entanto, resultados bastante contrastantes também foram encontrados nesses estudos, principalmente quanto à especificidade, possivelmente em decorrência de diferentes ensaios de sequenciamento utilizados (LONGSTAFF et al., 2017).

## 2.6 Tratamento e prevenção

Os tratamentos para a PIF se baseiam principalmente em impedir a replicação do vírus e modular a resposta imunológica do gato. São descritos experimentalmente uso de análogos de nucleosídeos, inibidores de protease e da polimerase viral (CAMERO et al., 2022). Entretanto, como a PIF é uma doença crônica e sistêmica, é difícil alcançar a remissão clínica (PEDERSEN, 2014).

A função do análogo de nucleosídeo GS5734, e sua formulação original GS-441524, é substituir a adenosina, encerrando a replicação viral (ADDIE et al., 2020). O análogo de nucleosídeo em questão também demonstrou eficácia por via oral, ao contrário das drogas antivirais anteriormente descritas, que devem ser administradas por via injetável, muitas vezes causando respostas inflamatórias graves (PEDERSEN et al., 2019).

Outro medicamento promissor, o inibidor de protease GC376, relatou efeitos antivirais significativos em gatos com PIF (KIPAR; MELI, 2014). Seu mecanismo de ação visa inibir enzimas necessárias para a clivagem de proteínas e para a maturação da estrutura viral. Estudos recentes demonstraram ação antiviral do itraconazol, um fármaco antifúngico, contra FCoV tipo I *in vitro*, sugerindo que o poderia ser potencialmente usado como terapêutico (TAKANO et al., 2019), entretanto ainda são necessários testes *in vivo* que comprovem sua eficácia.

Como a maioria desses medicamentos não estão disponíveis comercialmente no Brasil até o momento, o tratamento da PIF se baseia principalmente em tratar os sinais clínicos e fornecer qualidade de vida, através do fortalecimento nutricional, fluidoterapia parenteral, remoção de líquidos efusivos, transfusão sanguínea e também antimicrobianos quando há suspeita de infecções bacterianas secundárias (SHERDING, 2003). Os corticosteroides e as drogas citotóxicas, por seus efeitos anti-inflamatórios e imunossupressores, visam reduzir as reações inflamatórias imunomediadas que ocorrem na doença. Em contrapartida, podem afetar adversamente a imunidade celular, potencializando a infecção viral (SHERDING, 2003).

Uma vacina intranasal para PIF foi licenciada em alguns países, mas sua eficácia ainda é bastante questionada (LOVATO; DEZENGRINI, 2017), atualmente ela é considerada não recomendada pela *American Association of Feline Practitioners* (AAFP) e foi retirada do mercado (STONE et al., 2020). O principal motivo do questionamento seria pela possibilidade de os anticorpos exacerbarem os sinais clínicos (LOVATO; DEZENGRINI, 2017).

As medidas profiláticas são pouco efetivas devido ao FCoV estar amplamente disseminado na população felina, entretanto, é recomendado evitar a exposição ao vírus, manter os animais em quarentena, realizar higiene rigorosa, utilizando diversas caixas de areia e trocando regularmente. Alojamento em pequenos grupos, evitando grandes populações de gatos num mesmo ambiente, identificar e segregar possíveis transmissores assintomáticos do vírus (PEDERSEN, 2014).

### **3 Artigo**

#### **Mutation analysis of the spike protein in domestic cats infected with feline coronavirus with or without clinical signs relative to feline infectious peritonitis**

Autores: Ana Carolina de Assis Scariot, Winnie Oliveira dos Santos, Leonardo Clasen Ribeiro, Wellington da Silva, Renata Nobre da Fonseca, Marcelo de Lima, Geferson Fisher, Silvia de Oliveira Hübner.

Artigo submetido à revista Pesquisa Veterinária Brasileira

## Mutation analysis of the spike protein in domestic cats infected with feline coronavirus with or without clinical signs relative to feline infectious peritonitis

Ana Carolina de Assis Scariot<sup>2</sup> Winnie Oliveira dos Santos<sup>2</sup> Leonardo Clasen Ribeiro<sup>2</sup> Wellington da Rocha da Silva<sup>2</sup> Renata Nobre da Fonseca<sup>2</sup> Marcelo de Lima<sup>2</sup>, Geferson Fischer<sup>2</sup>, Silvia de Oliveira Hübner<sup>2\*</sup>

**ABSTRACT.-** Scariot A.C.A., Santos W.O., Ribeiro L.C., Silva W.R., Fonseca R.N., Lima M., Fischer G. & Hübner S.O. 2024. **Mutation analysis of the spike protein in domestic cats infected with feline coronavirus with or without clinical signs relative to feline infectious peritonitis.** *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 2024. Departamento Veterinária Preventiva, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas. Avenida Eliseu Maciel s/n, Prédio 1 Campus Capão do Leão, Capão do Leão, RS 96160-000, Brazil E-mail: [sohubner@yahoo.com.br](mailto:sohubner@yahoo.com.br)

The feline coronavirus (FCoV) includes two biotypes, responsible for an enteric disease (feline enteric coronavirus - FECV), or a feline infectious peritonitis (feline infectious peritonitis virus -FIPV), a lethal disease. While the exact genetic change that mediates the transition of FECV to FIPV and its increase in pathogenicity is unknown, there is evidence that specific mutations in the spike-protein (S) coding region play a major role. It has been suggested that the change in pathogenicity may be associated with mutations at two amino acid sites in the S protein: a methionine (M)-to-leucine (L) mutation at site 1058 (M1058L) and a serine (S)-to-alanine (A) mutation at site 1060 (S1060A). This study aimed to determine the presence of the M1058L or S1060A mutations in FCoV derived from domestic cats with or without clinical signs relative to FECV or FIPV infection. Rectal swabs, tissues, blood, and/or effusion (90 samples) collected from 77 cats were investigated to FCoV infection by PCR, revealing 26% of positive cats. Among the positive cases, 11 cats displayed enteric signs, 4 showed FIP signs, and 5 were asymptomatic. Out of the 9 strains (5 FECV and 4 FIPV) that were sequenced and analyzed for the mutations M1058L and S1060A, only one FIPV strain had the M1058L mutation and no sample contained the previously reported S1060A mutation. The data obtained in this study indicate that other genetic markers may be associated with the change in FCoV pathogenicity. Therefore, the presence of the mutations documented as M1058L and S1060A should not be the sole markers used to confirm feline infectious peritonitis.

INDEX TERMS: coronaviruses, feline infectious peritonitis, FCoV, RT-PCR.

**RESUMO.-** [Análise de mutação da proteína spike em gatos domésticos infectados por coronavírus felino com ou sem sinais clínicos relativos à peritonite infecciosa felina.] O coronavírus felino (FCoV) inclui dois biótipos, responsáveis por uma doença entérica (coronavírus entérico felino - FECV), ou uma peritonite infecciosa felina (vírus da peritonite infecciosa felina -FIPV), uma doença letal. Embora a alteração genética exata que medeia a transição do FECV para o FIPV e o seu aumento na patogenicidade seja desconhecida, há evidências que mutações específicas na região codificadora da proteína spike (S) tenha uma importante papel. Foi sugerido que a alteração de patogenicidade possa estar associada a mutações em dois locais de aminoácidos na proteína S: uma mutação de metionina (M)-para-leucina (L) no sítio 1058 (M1058L) e uma mutação de serina (S)-para-alanina (A) no sítio 1060 (S1060A). Este estudo teve como objetivo determinar a presença das mutações M1058L e S1060A em FCoV derivados de gatos domésticos com ou sem sinais clínicos relacionados à infecções por FECV ou FIPV. Swabs retais, tecidos, sangue e/ou efusão (90 amostras) coletados de 77 gatos foram investigados para infecção por FCoV por PCR, revelando 26% de gatos positivos, sendo 11 deles com sinais entéricos, 4 com sinais de FIP e 5 assintomáticos. De 9 cepas (5 FECV e 4 FIPV) sequenciadas e analisadas para as mutações M1058L e S1060A, apenas uma cepa de FIPV continha a mutação M1058L e nenhuma continha a mutação S1060A anteriormente relatada. Os dados obtidos indicam que outros marcadores genéticos possam estar associados à mudança de patogenicidade do FCoV e, portanto, a presença das mutações M1058L e S1060A não devem ser usadas como únicos marcadores para confirmação de peritonite infecciosa felina.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: coronaviroses, peritonite infecciosa felina, FCoV, RT-PCR.

### INTRODUCTION

Feline coronavirus (FCoV) belongs to the family Coronaviridae and genus Alphacoronavirus (ICTV 2019) and is highly prevalent among domestic cat populations worldwide (Pedersen et al. 2009). There are two



genotypes of the virus: FCoV type I and type II. Each genotype includes two different biotypes called feline enteric coronavirus (FECV) and feline infectious peritonitis virus (FIPV) (Wang et al. 2013). The FIPV biotype is more virulent than the FECV biotype and is associated with the development of fatal multisystemic peritonitis, for which no effective treatment or vaccine is currently available. On the other hand, most FECV biotypes do not cause lesions, and even the most virulent strains cause only mild intestinal symptoms (Gao et al. 2023). Feline infectious peritonitis (FIP) is more common in young cats and approximately 5 to 10% of FCoV-seropositive cats develop the disease (Pedersen et al. 2009). FIP can appear in two forms: the effusive form, which is the most common and is characterized by fluid build-up in the abdomen, thorax, and/or pericardium (Hartmann, 2005, Pedersen et al. 2009), and the non-effusive form, characterized by the presence of granulomas in organs (Hartmann 2005). The clinical signs of FIP are highly variable, as due to the systemic spread of the virus, several organs may be involved, in addition to ophthalmic and neurological changes being described. The pathogenesis that leads to the development of FIP is not yet fully understood, but the main theory is that one or more mutations in a specific FECV gene or genes would lead to its development (Addie et al. 2009). Furthermore, it is believed that the FECV biotype adapts to proliferate in monocytes/macrophages, which promotes a change in the virulence of virions, resulting in biotype conversion to FIPV (Pedersen 2014, Tekes & Thiel 2016). However, the change in cell tropism does not reveal the true mechanism of internal mutation. Consequently, many studies attempt to explain the mechanism of mutation at the molecular and genetic levels. The FCoV genome encodes four structural proteins – spike (S), envelope (E), membrane (M), and nucleocapsid (N), and seven nonstructural proteins (replicase 1a and 1b and accessory proteins 3a, 3b, 3c, 7a, and 7b). Three different genes have been associated with the conversion of FECV to FIPV. The first gene suspected to be a general virulence marker indicative of Feline Infectious Peritonitis (FIP) was the 3c gene (Vennema et al. 1998). Initial studies indicated that FECVs always contained a complete 3c gene, while FIPV contained mutations (such as deletions or point mutations) that hindered the translation of an intact protein (Pedersen et al. 2009, Hora et al. 2016). Later studies have shown that an intact 3c gene is required for viral replication in the intestine but is not essential for systemic replication of FIPVs (Chang et al. 2010, Chang et al. 2012, Pedersen et al. 2012, Bank-Wolf et al. 2014). It is now considered likely that mutations in 3c gene do not affect the virulence (Lutz et al. 2020). Some research has indicated that the nonstructural glycoprotein 7b may play a role in determining FCoV virulence. The loss of its integrity, which occurs predominantly during cell culture passage, leads to a loss of virulence in FIPVs (Dedeurwaerder et al. 2013). Subsequent studies, however, have demonstrated that the highly conserved 7b gene cannot serve as a valid gene for differentiating biotype switching. Since 2012, research on the pathogenesis of FIP has increasingly focused on the S gene, responsible for encoding the spike protein (S). The S protein of the coronavirus plays a pivotal role in binding to the cellular receptor for viral infection, and the transition from FECV to FIPV involves alterations in cellular tropism. Consequently, it has been postulated that variations in FCoV biotypes may also be linked to mutations in the S genes. In this context, it has been identified that differences in the S proteins between FECV and FIPV include mutations at two amino acid: a mutation from methionine (M) to leucine (L) at site 1058, and a mutation from serine (S) to alanine (A) at site 1060 (Chang et al. 2012). These mutations are associated with adaptability for infecting macrophages (Bank-Wolf et al. 2014, Jaimes & Whittaker, 2018, Ouyang et al. 2022, Shirato et al. 2018). The presence of one or both of these mutations was identified in over 95% of the FIPV strains analyzed in the Netherlands (Chang et al. 2012). The specific role of these mutations in the S gene concerning the pathogenesis of FIP remains unclear. So far, there are no records of studies on the occurrence of these mutations in FCoV among cats in Brazil or even in the Americas. The objective of this study was to ascertain the presence of the M1058L or S1060A mutations in FCoVs obtained from domestic cats, with or without clinical signs related to infection by FECV or FIPV biotypes.

## MATERIALS AND METHODS

**Animals and samples.** For the present study, 90 samples were collected from 77 domestic cats received at veterinary clinics and hospitals in Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil, between November 2020 and December 2021. Of the samples obtained, 47 cats had enteric signs (diarrhea), 15 cats presented signs compatible with FIP (pleural or abdominal effusion, ascite or a combination of both), and 15 cats did not present any clinical signs of disease. The samples collected were: rectal swabs (70), blood (3), abdominal effusion (8), pleural effusion (3), kidney (1), liver (1), spleen (1), intestine (1), omentum (1) and lymph node (1). Information on history and clinical signs was obtained through anamnesis. Samples were stored in RNAlater™ Stabilization Solution (Invitrogen™, USA) and kept at -80 °C until processing.

**FCoV detection.** For FCoV detection, a semi-nested PCR targeting amplification of a highly conserved segment of the M gene was performed (Pratelli et al. 1999). RNA from effusion, blood and rectal swab samples was extracted using the BioGene viral DNA/RNA extraction kit (Bioclin/Quibasa – Química

Básica Ltda., MG, Brazil) following the manufacturer's instructions. RNA from organs was extracted using the TRIzol® Reagent protocol. After quantification and conversion to cDNA using High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Applied Biosystems™, MA, USA), the samples were subjected to semi-nested RT-PCR. The PCR cycling conditions were 95 °C for 7 min, 40 cycles of 94, 55, and 72 °C for 1 min at each temperature, and 72 °C for 7 min. For the second round of RT-PCR amplification, a 3 µL aliquot of the 1:100 dilution of the first amplicon was subjected to the same cycling procedures described previously. RT-PCR products were detected after ethidium bromide-stained agarose gel electrophoresis and visualization under ultraviolet light.

#### **Amplification, sequencing, and analysis of the spike (S) gene from FCoV-positive samples.**

From the positive samples, an RT-PCR was performed to amplify a 215-bp fragment for FCoV-I and a 250-bp fragment for FCoV-II, including codons for residues of the S protein potentially affected by the M1058L and S1060A mutations, as described by Decaro et al. (2021). Reactions were performed in a volume of 25 µL using 100-200 ng of cDNA, 12.5 µL of GoTaq® Colorless Master Mix (Fitchburg, WI, USA), and 10 pmol of each forward and reverse primer. PCR cycling conditions were 94 °C for 5 minutes, 45 cycles of 94 °C (30 seconds), 50 °C (30 seconds) and 68 °C (45 seconds) and final extension at 72 °C for 10 min. Products were detected after ethidium bromide agarose gel electrophoresis and visualization under ultraviolet light.

RT-PCR products were purified using Promega® Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo Kit (Promega Corporation, WI, EUA). The samples were sequenced in duplicate using BigDye Terminator Cycle Sequencing kit (Thermo Fischer) to confirm sequence identity. Sequence editing, alignment and phylogenetic analyses were conducted using Geneious alignment and Geneious tree builder plugins implemented in Geneious software version 9.1.8 (Biomatters). Nucleotide (nt) sequences of the S gene were converted into amino acid (aa) sequences and comparative sequence analysis with coronavirus sequences was carried out in the S protein fragment encompassing residues 1058 and 1060. Initially the obtained sequences were compared with reference strains for classification into FECV and FIPV biotypes. Based on the homology with each biotype and the clinical signs described, the samples were classified as FECV or FIPV. Nucleotide sequences from FCoV reference strains used for alignment and sequence analysis were retrieved from the NCBI database under the following GeneBank accession numbers: FIV-I-Black, EU186072, FIPV-I-C1J, DQ848678, FCoV-I-RM, FJ938051, FCoV-I-UU54, JN183883, FCoV-I-UU7, FJ938053, FIPV-II-DF-2, JQ408981, MW316838.1, MT181982.1, MW225980, MW225984, MW815652.1 and MH817484 (the only complete genome sequence of a FCoV strain from Brazil, Barros et al. 2019).

### **RESULTS AND DISCUSSION**

All collected samples were evaluated by a semi-nested RT-PCR targeting amplification of a conserved segment of the FCoV M gene. Of the 77 cats evaluated, 20 (26%) tested positive, 11 of which exhibited enteric signs, 4 displayed signs of FIP and 5 were asymptomatic. FCoV RNA was detected from different types of samples (blood, effusion, rectal swab, spleen, lymph nodes and omentum). Positive samples at this stage were then evaluated by an RT-PCR targeting a region of the FCoV S gene, with 16 (21%) of the total testing positive. The lower number of positive results in this RT-PCR is attributed to the variability described in the spike glycoprotein gene. The S gene undergoes environmental adaptation, and variations in this gene are often related, having important evolutionary significance in analyzing epidemic trends (Chang et al. 2012).

From the description that two amino acid substitutions, M1058L and/or S1060A within the S protein were associated with the change in virulence from FECV to FIPV (Chang et al. 2012), several studies had been performed to investigate the presence of such changes (Bank-Wolf et al. 2014, Lewis et al. 2015, McKAY et al. 2020, Decaro et al. 2021, Song et al. 2023). The functional consequences of the M1058 and S1060A alterations have not yet been determined, however, as they are located in the hydrophobic domain of the fusion protein, they could be associated with greater virulence and consequent systemic transmission of the virus (Chang et al. 2012). In this context, a new PCR test could be developed to identify the presence of these mutations, which could indicate FIPV and provide a diagnosis. Our study investigated such mutations in samples from cats with FCoV who were either asymptomatic, presented digestive diseases (diarrhea and/or vomiting), or showed clinical signs compatible with FIP. Sequence amplicons were generated from positive samples of nine cats: five with diarrhea (from fecal samples) and four with clinical signs compatible with FIP (from organs or ascites). By phylogenetic analysis, these FCoV sequences were clustered according to the biotype and clinical signals in FECV (5) and FIPV strains (4). The nucleotide sequences obtained were eligible for translation into amino acids and were compared with reference sequences. The presence of a mutation at amino acid residue 1058 was detected, with a methionine substituting a leucine (M1058L), in a strain from a cat showing clinical signs and complementary exams consistent with FIP. No alteration was observed at amino acid residue 1060 (S1060A) in any sequenced strain. Our results diverge from previous reports: in the study by Chang et al (2012) of 118 FIPVs, 108 (91.5%) had the M1058L mutation. The M1058L and S1060A mutations were

observed in 17/19 and 2/19 strains circulating in Italy, associated with FIP, respectively (Decaro et al. 2021). Other studies have also detected the mutation related to the M1058L residue in FIPV strains (Bank-Wolf et al. 2014, Lewis et al. 2015, Sangl et al. 2020). In samples from China, Zhu et al. (2024) demonstrated that all parenteral samples from FIP cats carried one or more of the M1058L mutation, S1060A mutation, and mutated 3c gene. Porter et al. (2014) state that the M1058L mutation may not cause the transformation to FIPV, although it may induce changes in cell tropism. They believe that the substitution M1058L serves solely as an indicator of the systemic spread of FCoV from the gastrointestinal tract, and should not be relied upon as a confirmatory marker for FIP.

The absence of the M1058L mutation in the FECV biotype has also been suggested (Chang et al. 2012, Decaro et al. 2021). In our study, no such mutation was detected in FECV strains. However, a study by Porter et al. (2014) using fecal and tissue samples of FECV and FIPV found leucine at position 1058 in tissues, regardless of whether cats were infected with FECV or FIPV. This demonstrates that it may be more related to the systemic spread of the virus and not to the occurrence of FIPV.

It's possible that the FIPVs found in the studied region may have unidentified alternative virulence sites. According to Shirato et al. (2018), the different behavior of macrophage infection could be due to the combined effect of five mutations in five distinct domains of the S2 fusion subunit. Therefore, since most FIPV strains in the current study did not have the previously described mutations M1058L or S1060A, these mutations alone cannot confirm the diagnosis of FIP. This suggests that other genetic markers should be considered in relation to the change in FCoV pathogenicity.

FCoV transmission occurs via the fecal-oral route. Some studies suggest that infected cats can excrete FECV in their feces for more than 15 weeks (Tekes, Thiel, 2016, Bubenikova et al. 2020). According to Addie & Jarrett (2001), around 13% of infected cats become carriers and likely remain healthy carriers throughout their lives, intermittently excreting the virus in their feces. In settings with multiple cats, the number of shedding events and the frequency of shedding are risk factors for the development of FIP in individual cats (Foley et al. 1997). The present study revealed that 21% (16/77) of the evaluated cats were shedding FCoV in their feces, as indicated by positive rectal swab samples. Among the 47 cats with enteric signs, 11 (23%) tested positive for FCoV. Among the asymptomatic cats evaluated, 5 out of 15 (33%) were found to be excreting the virus, indicating a significant source of virus transmission and population maintenance. These data indicate that an important strategy for controlling the disease must involve identifying and isolating asymptomatic carriers within the population. In all cats showing clinical signs compatible with FIP, and in which tissue, blood, and/or effusion samples presented positive results, no viral RNA was detected in rectal swab samples. In agreement with these results, other studies indicate that FCoV excretion in feces occurs only in cats infected with the FECV biotype (Pedersen et al. 2009, Chang et al. 2012).

## CONCLUSION

In the present investigation, most FIPV strains found in cats presenting enteric disease or FIP did not exhibit the M1058L or S1060A mutations as described in previous studies. The results indicate that the M1058L and S1060A amino acid mutations cannot be considered exclusive for the diagnosis of FIP nor as the only indicators associated with the change in virulence from FECV to FIPV.

**Acknowledgments.-** The authors acknowledge the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for granting scholarships, and the Universidade Federal de Pelotas (UFPel).

**Conflict of interest statement.-** The authors declare that there are no conflicts of interest.

## REFERENCES

- Addie D., Belák S., Boucraut-Baralon C., Egberink H., Frymud T., Gruffydd-Jones T., Hartmann K., Hosie M.J., Lloret A., Lutz H., Marsilio F., Pennisi M.G., Rasford A.D., Thiry E., Truyen U. & Horzinek M.C. 2009. Feline Infectious Peritonitis: ABCD Guidelines on prevention and management. *J. Feline Med. Surg.* 11(7): 529–529. <<https://doi.org/10.1016/j.jfms.2009.05.001>>
- Addie D.D. & Jarrett O. 2001. Use of a reverse-transcriptase polymerase chain reaction for monitoring the shedding of feline coronavirus by healthy cats. *Vet. Rec.* 148: 649–653. <<https://doi.org/10.1136/vr.148.21.649>>
- Bank-Wolf, B.R., Stallkamp I., Wiese S., Moritz A., Tekes G. & Thiel H.J. 2014. Mutations of 3c and Spike Protein Genes Correlate with the Occurrence of Feline Infectious Peritonitis. *Vet. Microbiol.* 173 (3): 177–88. <<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.07.020>>

- Barros B.C.V., Castro C.M.O., Pereira D., Ribeiro L. G., Júnior J.W.B.D., Casseb S.M.M., Holanda G.M., Cruz A.C.R., Júnior E. C. S. & Mascarenhas J. D. P. 2019. First Complete Genome Sequence of a Feline Alphacoronavirus 1 Strain from Brazil. *Mic. Res. Ann.* 8(10), e01535-18. <<https://doi.org/10.1128/MRA.01535-18>>
- Bubenikova J., Vrabelova J., Stejskalova K., Futas J., Plasil M., Cerna P., Oppelt J., Lobova D., Molinkova D. & Horin P. 2020. Candidate Gene Markers Associated with Fecal Shedding of the Feline Enteric Coronavirus (FECV). *Pathogens*. 9(11), 958. <<https://doi.org/10.3390/pathogens9110958>>
- Chang H.W., De Groot R.J., Egberink H.F. & Rottier, P.J.M. 2010. Feline infectious peritonitis: Insights into feline coronavirus pathobiogenesis and epidemiology based on genetic analysis of the viral 3c gene. *J. Gen Virol*, 91(2), 415–420. <<https://doi.org/10.1099/vir.0.016485-0>>
- Chang H.-W., Egberink H.F., Halpin R., Spiro D.J. & Rottier P.J.M. 2012. Spike Protein Fusion Peptide and Feline Coronavirus Virulence. *Emerg. Infect. Dis.* 18(7), 1089–1095. <<https://doi.org/10.3201/eid1807.120143>>
- Decaro N., Mari V., Lanave G., Lorusso E., Lucente M.S., Desario C., Colaianni M.L., Elia G., Ferringo F., Alfano F. & Buonavoglia C. 2021. Mutation analysis of the spike protein in Italian feline infectious peritonitis virus and feline enteric coronavirus sequences. *Res. Vet. Sci.* 135, 15–19. <<https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.12.023>>
- Dedeurwaerder A., Desmarests L.M., Olyslaegers D.A. J., Vermeulen B.L., Dewerchin H.L. & Nauwynck, H.J. 2013. The role of accessory proteins in the replication of feline infectious peritonitis virus in peripheral blood monocytes. *Vet. Microbiol.*, 162(2–4), 447–455. <<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.10.032>>
- Foley J.E., Poland A., Carlson J. & Pedersen N.C. 1997. Risk factors for feline infectious peritonitis among cats in multiple-cat environments with endemic feline enteric coronavirus. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 210(9), 1313–1318. <<https://doi.org/10.2460/javma.1997.210.09.1313>>
- Gao Y.-Y., Wang Q., Liang X.-Y., Zhang S., Bao D., Zhao H., Li S.-B., Wang K., Hu G.-X. & Gao F.-S. 2023. An updated review of feline coronavirus: Mind the two biotypes. *Virus Res.* 326, 199059. <<https://doi.org/10.1016/j.virusres.2023.199059>>
- Hartmann K. 2005. Feline infectious peritonitis. *Vet. Clin. North Am Small Anim Pract* 35(1), 39–79. <<https://doi.org/10.1016/j.cvs.2004.10.011>>
- Hora A.S., Tonietti P.O., Taniwaki S.A., Asano K.M., Maiorka P., Richtzenhain L.J. & Brandão P.E. 2016. Feline Coronavirus 3c Protein: A Candidate for a Virulence Marker? *Biomed. Res. Int.* 2016, 1–9. <<https://doi.org/10.1155/2016/8560691>>
- ICTV 2019. Taxonomy history: Coronaviridae. International Committee on Taxonomy of Viruses . Available at < [https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv\\_9th\\_report/positive-sense-rna-viruses-011/w/posrna\\_viruses/222/coronaviridae](https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/positive-sense-rna-viruses-011/w/posrna_viruses/222/coronaviridae)> Accessed on Dec 23, 2021.
- Jaimes J.A. & Whittaker G.R. 2018. Feline coronavirus: Insights into viral pathogenesis based on the spike protein structure and function. *Virology*. 517, 108–121. <<https://doi.org/10.1016/j.virol.2017.12.027>>
- Lewis C.S., Porter E., Matthews D., Kipar A., Tasker S., Helps C.R. & Siddell S.G. 2015. Genotyping coronaviruses associated with feline infectious peritonitis. *J. Gen. Virol.* 96(6), 1358–1368. <<https://doi.org/10.1099/vir.0.000084>>
- Licitra B.N., Millet J.K., Regan A.D., Hamilton B.S., Rinaldi V.D., Duhamel G.E. & Whittaker G.R. 2013. Mutation in Spike Protein Cleavage Site and Pathogenesis of Feline Coronavirus. *Emerg. Infect. Dis.* 19(7), 1066–1073. <<https://doi.org/10.3201/eid1907.121094>>
- Lutz M., Steiner A.R., Cattori, V., Hofmann-Lehmann R., Lutz H., Kipar A. & Meli M.L. 2020. FCoV Viral Sequences of Systemically Infected Healthy Cats Lack Gene Mutations Previously Linked to the Development of FIP. *Pathogens*. 9(8), 603. <<https://doi.org/10.3390/pathogens9080603>>
- McKay L.A., Meachem M., Snead E., Brannen T., Mutlow N., Ruelle L. & Davies, J.L. 2020. *Prevalence and mutation analysis of the spike protein in feline enteric coronavirus and feline infectious peritonitis detected in household and shelter cats in western Canada.* *Can. J. Vet. Res.* 84 (1), 18-23. <PMid: 31949325>
- Ouyang H., Liu J., Yin Y., Cao S., Yan R., Ren Y., Zhou D., Li Q., Li J., Liao X., Ji W., Du B., Si Y. & Hu C. 2022. Epidemiology and Comparative Analyses of the S Gene on Feline Coronavirus in Central China. *Pathogens*, 11(4), 460. <<https://doi.org/10.3390/pathogens11040460>>

- Pedersen N.C. 2014. An update on feline infectious peritonitis: Virology and immunopathogenesis. *Vet. J.* 201(2), 123–132. <<https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2014.04.017>>
- Pedersen N.C., Liu H., Dodd K.A. & Pesavento P.A. 2009. Significance of Coronavirus Mutants in Feces and Diseased Tissues of Cats Suffering from Feline Infectious Peritonitis. *Viruses*. 1(2), 166–184. <<https://doi.org/10.3390/v1020166>>
- Pedersen N.C., Liu H., Scarlett J., Leutenegger C.M., Golovko L., Kennedy H. & Kamal F.M. 2012. Feline infectious peritonitis: Role of the feline coronavirus 3c gene in intestinal tropism and pathogenicity based upon isolates from resident and adopted shelter cats. *Virus. Res.* 165(1), 17–28. <<https://doi.org/10.1016/j.virusres.2011.12.020>>
- Porter E., Tasker S., Day M.J., Harley R., Kipar A., Siddell S.G. & Helps C.R. 2014. Amino acid changes in the spike protein of feline coronavirus correlate with systemic spread of virus from the intestine and not with feline infectious peritonitis. *Vet. Res.* 45(1), 49. <<https://doi.org/10.1186/1297-9716-45-49>>
- Pratelli A., Tempesta M., Greco G., Martella V. & Buonavoglia C. 1999. Development of a nested PCR assay for the detection of canine coronavirus. *J. Virol. Methods.*, 80(1), 11–15. <[https://doi.org/10.1016/S0166-0934\(99\)00017-8](https://doi.org/10.1016/S0166-0934(99)00017-8)>
- Sangl L., Felten S., Matiasek K., Dörfelt S., Bergmann M., Balzer H.J., Pantchev N., Leutenegger C. & Hartmann K. 2020. Detection of feline coronavirus RNA, spike gene mutations, and feline coronavirus antigen in macrophages in aqueous humor of cats in the diagnosis of feline infectious peritonitis. *J. Vet. Diagn. Invest.* 32(4), 527–534. <<https://doi.org/10.1177/1040638720927362>>
- Shirato K., Chang H.W. & Rottier, P. J. M. 2018. Differential susceptibility of macrophages to serotype II feline coronaviruses correlates with differences in the viral spike protein. *Virus. Res.*, 255, 14–23. <<https://doi.org/10.1016/j.virusres.2018.06.010>>
- Song X.L., Li W.F., Shan H., Yang H.Y. & Zhang, C.M. 2023. Prevalence and genetic variation of the M, N, and S2 genes of feline coronavirus in Shandong Province, China. *Arch. Virol.* 168(9), 227. <<https://doi.org/10.1007/s00705-023-05816-4>>
- Tekes G. & Thiel H.J. 2016. Feline Coronaviruses: Pathogenesis of Feline Infectious Peritonitis, p.193-218. In: Zibuhr J. (Ed), *Advances in Virus Research*. Vol. 96 ed. Elsevier. <<https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2016.08.002>>
- Vennema H., Poland A., Foley J. & Pedersen N.C. 1998. Feline Infectious Peritonitis Viruses Arise by Mutation from Endemic Feline Enteric Coronaviruses. *Virology*, 243(1), 150–157. <<https://doi.org/10.1006/viro.1998.9045>>
- Wang Y.T., Su B.L., Hsieh L.E. & Chueh, L.-L. 2013. An outbreak of feline infectious peritonitis in a Taiwanese shelter: Epidemiologic and molecular evidence for horizontal transmission of a novel type II feline coronavirus. *Vet. Res.*, 44(1), 57. <<https://doi.org/10.1186/1297-9716-44-57>>
- Zhu J., Deng S., Mou D., Zhang G., Fu Y., Huang W., Zhang Y. & Lyu, Y. 2024. Analysis of spike and accessory 3c genes mutations of less virulent and FIP-associated feline coronaviruses in Beijing, China. *Virology*. 589, 109919. <<https://doi.org/10.1016/j.virol.2023.109919>>

#### 4 Considerações Finais

Os resultados obtidos na presente dissertação permitem concluir que o FCoV está presente na população de gatos domésticos na cidade de Pelotas. O FCoV pôde ser detectado principalmente em amostras de tecido de animais sintomáticos, nestes não sendo possível a detecção através de *swab* retal. Embora, também pôde ser detectado em animais assintomáticos em amostras de *swab* retal.

Assim como, a totalidade das cepas encontradas foram FCoV sorotipo I, demonstrando a prevalência deste sorotipo nos gatos avaliados na região. Através do sequenciamento genético foi possível verificar a presença da mutação no resíduo de aminoácido 1058 de apenas uma das cepas encontradas, de um gato com sintomatologia e exames complementares compatíveis com PIF, enquanto as demais cepas avaliadas não apresentaram mutações nos resíduos 1058 e 1060 da região S do FCoV. Não apresentando resultados conclusivos para o diagnóstico de PIF através destes marcadores.

## Referências

ADDIE, D.; COVELL-RITCHIE, J.; JARRETT, O.; FOSBERY, M. Rapid Resolution of Non-Effusive Feline Infectious Peritonitis Uveitis with an Oral Adenosine Nucleoside Analogue and Feline Interferon Omega. **Viruses**. v. 12, n.11, p. 1216. 2020.

ADDIE, D. Feline Coronavirus Infections. **In: Greene. Infectious Diseases of the Dog and Cat**, Elsevier. St. Louis. USA. v. 4, p. 102–108, 2012.

ADDIE, D. et al.; Feline infectious peritonitis. Abcd guidelines on prevention and management. **Journal of Feline Medicine and Surgery**. v. 11, p. 594–604, 2009.

ADDIE, D.; SCHAAP, I., NICOLSON, L.; JARRETT, O. Persistence and transmission of natural type I feline coronavirus infection. **Journal of General Virology**. v. 84, p. 2735–2744, 2003.

ALMEIDA, A. C. S.; GALDINO, M. V.; ARAÚJO JR, J. P. Seroepidemiological study of feline coronavirus (FCoV) infection in domiciled cats from Botucatu, São Paulo, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 39, n. 2, p. 129-133. 2019.

BANK-WOLF, B. R.; STALLKAMP, I.; WIESE, S.; MORITZ, A., TEKES, G.; THIEL, H. J. Mutations of 3c and spike protein genes correlate with the occurrence of feline infectious peritonitis. **Veterinary Microbiology**. v. 173, n. 3-4, p. 177–188, 2014.

BARKER, E. N.; STRANIERI, A.; HELPS, C. R.; PORTER, E. L.; DAVIDSON, A. D.; DAY, M. J.; KNOWLES, T.; KIPAR, A.; TASKER, S. Limitations of using feline coronavirus spike protein gene mutations to diagnose feline infectious peritonitis. **Veterinary Research**. v. 48, p. 60, 2017.

BELOUZARD, S.; MILLET, J. K.; LICITRA, B. N.; WHITTAKER, G. R. Mechanisms of coronavirus cell entry mediated by the viral spike protein. **Viruses**. v. 4, n. 6, p. 1011-33, 2012.

BOSCH, B.J.; VAN DER ZEE, R.; DE HAAN, C.A.M.; ROTTIER, P.J.M. The coronavirus spike protein is a class I virus fusion protein: structural and functional characterization of the fusion core complex. *Journal of Virology*. v. 77 , p. 8801-8811, 2003.

BROWN, M. A.; TROYER, J. L.; PECON-SLATTERY, J.; ROELKE, M. E.; O'BRIEN, S. J. Genetics and pathogenesis of feline infectious peritonitis virus. **Emerging Infectious Disease**. v.15, n.9, p.1445–1452, 2009.

BUBENIKOVA, J.; VRABELOVA, J.; STEJSKALOVA, K.; FUTAS, J.; PLASIL, M.; CERNA, P.; OPPELT, J.; LOBOVA, D.; MOLINKOVA, D.; HORIN, P. Candidate Gene Markers Associated with Fecal Shedding of the Feline Enteric Coronavirus (FECV). **Pathogens**. v. 9, n. 11, p. 958, 2020.

BUBENIKOVA, J.; BUBENIKOVA, J.; VYCHODILOVA, L.; STEJSKALOVA, K.; FUTAS, J.; OPPELT, J.; CERNA, P.; PLASIL, M.; HORIN, P. The Population Diversity of Candidate Genes for Resistance/Susceptibility to Coronavirus Infection in Domestic Cats: An Inter-Breed Comparison. **Pathogens**. v. 10, n. 6, p- 778. 21. 2021.

CAMERO, M.; LANAVE, G.; CATELLA C.; LUCENTE, M. S.; SPOSATO, A.; MARI, V.; TEMPESTA, M.; MARTELLA, V.; BUONAVOGLIA, A. ERDRP-0519 inhibits feline coronavirus in vitro. **BMC Veterinary Research**. v. 18, n. 1, p. 55. 2022.

CHANG, H. W.; EGBERINK, H. F.; HALPIN, R.; SPIRO, D. J.; ROTTIER, P. J. Spike protein fusion peptide and feline coronavirus virulence. **Emerging Infectious Diseases**. v. 18, n.7, p. 1089–1095, 2012.

CHANG, H. W.; DE GROOT, R. J.; EGBERINK, H. F.; ROTTIER, P. J. Feline infectious peritonitis: insights into feline coronavirus pathobiogenesis and epidemiology based on genetic analysis of the viral 3c gene. **Journal Of General Virology**. v. 91, p. 415–420, 2010.

DECARO, N.; MARI, V.; LANAVE, G.; LORUSSO, E.; LUCENTE, M. S.; DESARIO, C.; COLAIANNI, M. L.; ELIA, G.; FERRINGO, F.; ALFANO, F.; BUONAVOGLIA, C. Mutation analysis of the spike protein in Italian feline infectious peritonitis virus and feline enteric coronavirus sequences. **Research in Veterinary Science**. v. 135, p. 15-19, 2021.

DEDEURWAERDER, A.; OLYSLAEGERS, D.; DESMARETS, L.; ROUKAERTS, I.; THEUNS, S.; NAUWYNCK, H. J. ORF7-encoded accessory protein 7a of feline infectious peritonitis virus as a counteragent against IFN- $\alpha$ -induced antiviral response. **Journal of General Virology**. v. 95, c. 2, p. 393-402, 2014.

DEWERCHIN, H. L.; CORNELISSEN, E.; NAUWYNCK, H. J. Replication of feline coronaviruses in peripheral blood monocytes. **Archives of Virology**. v. 150, n. 12, p. 2483-500, 2005.

DRECHSLER, Y.; ALCARAZ, A.; BOSSONG, F. J.; COLLISSON, E. W.; DINIZ, P. P. Feline coronavirus in multicat environments. **Veterinary Clinical North America Small Animal Practice**. v 41, p. 1133–69, 2011.

DURAN, C.; APPLEBY, N.; EDWARDS, D.; BATLEY, J. Molecular Genetic Markers: Discovery, Applications, Data Storage and Visualisation. **Current Bioinformatics**. v. 4, n. 1, p. 16–27, 2009.



DYE C., SIDDELL S. G. Genomic Rna Sequence of Feline Coronavirus Strain Fcov. **Journal of Feline Medicine and Surgery**. v. 9. p. 202–213. 2007.

ECHETO, O. A.; MADRIGAL, K.; ADMADÉ, M.; OVIEDO, O. V.; MORENO, A.; SIMOES, D. Peritonitis infecciosa felina, gastroenteritis y colangiohepatitis parasitaria (platinosomiasis) con colangiocarcinoma hepático: estudio clínico y anatomopatológico de tres casos. **Revista Científica De La Facultad De Ciencias Veterinarias De La Universidad Del Zulia**. v. 15, n. 3, p. 195–203, 2005.

FELTEN, S.; LEUTENEGGER, C. M.; BALZER, H. J.; PANTCHEV, N.; MATIASEK, K.; WESS, G.; EGBERINK, H.; HARTMANN, K. Sensitivity and specificity of a realtime reverse transcriptase polymerase chain reaction detecting feline coronavirus mutations in effusion and serum/plasma of cats to diagnose feline infectious peritonitis. **BMC Veterinary Research**. v. 13, p. 228, 2017.

FELTEN, S.; HARTMANN, K. Diagnosis of Feline Infectious Peritonitis: A Review of the Current Literature. **Viruses**. v. 11, n. 11, p. 1068. 2019.

FISCHER, Y.; SAUTER-LOUIS, C.; HARTMANN, K. Diagnostic accuracy of the Rivalta test for feline infectious peritonitis. **Veterinary Clinical Pathology**. v. 41, n. 4, p. 558–567. 2012.

FLORES, E. F. **Virologia Veterinária. Virologia Geral e Doenças Víricas**. Santa Maria: UFSM. v. 3, e. 3, c. 25, p. 885, 2017.

FOLEY, J.; POLAND, A.; CARLSON, J.; PEDERSEN, N. C. Risk factors for feline infectious peritonitis among cats in multiple-cat environments with endemic feline enteric coronavirus. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v. 210, n. 9, p. 1313–1318. 1997.

GRIBBLE, J.; STEVENS, L. J.; AGOSTINI, M. L.; ANDERSON-DANIELS, J.; CHAPPELL, J. D.; LU, X.; PRUIJSSERS, A. J.; ROUTH, A. L.; DENISON, M. STEVENS, L. J.; AGOSTINI, M. L.; ANDERSON-DANIELS, J.; CHAPPELL, J. D.; LU, X.; PRUIJSSERS, A. J.; ROUTH, A. L.; DENISON, M. R. R. The coronavirus proofreading exoribonuclease mediates extensive viral recombination. **PLoS Pathogens**. v. 17, n. 1. 2021.

HAIJEMA, B. J.; VOLDERS, H.; ROTTIER, P. J. Live, attenuated coronavirus vaccines through the directed deletion of group-specific genes provide protection against feline infectious peritonitis. **Journal of Virology**. v. 78, p. 3863–387, 2004.

HARTMANN, K.; BINDER, C.; HIRSCHBERGER, J.; COLE, D.; REINACHER, M.; SCHROO, S.; FROST, J.; EGBERINK, H.; LUTZ, H.; HERMANN, W. Comparison of different tests to diagnose feline infectious peritonitis. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v. 17, n. 6, p. 781-90, 2003.

HARTMANN, K. Feline Infectious Peritonitis. **Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice**. v. 35, p. 39–79, 2005.

HERREWEGH, A.; SMEENK, I.; HORZINEK, M. C.; ROTTIER, P. J.; DE GROOT, R. J. Feline coronavirus type ii strains 79- 1683 and 79-1146 originate from a double recombination between feline coronavirus type I and canine coronavirus. **Journal of Virology**. v. 72, p. 4508–14, 1998.

HORA, A. S. **Diversidade gênica do coronavírus felino em populações virais entéricas e sistêmicas intra e inter-hospedeiros**. 72 p. 2014. Tese de Doutorado em Medicina Veterinária - Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária. São Paulo. 2014.

HORA, A. S.; TONIETTI, P. O.; TANIWAKI, S. A.; ASANO, K. M.; MAIORKA, P.; RICHTZENHAIN, L. J.; BRANDÃO, P. E. Feline coronavirus 3c protein: a candidate for a virulence marker? **BioMed Research International**. v 16, p. 1-9, 2016.

JAIMES, J. A.; MILLET, J. K.; STOUT, A. E.; ANDRÉ, N. M.; WHITTAKER, G. R. A Tale of Two Viruses: the distinct spike glycoproteins of feline Coronaviruses. **Viruses**. v. 10, n.12, p. 83. 2020.

JAIMES, J. A.; WHITTAKER, G.R. Feline coronavirus: Insights into viral pathogenesis based on the spike protein structure and function. **Virology**. v. 517, p. 108–121. 2018.

JOHANN, J. M.; CAETANO, C.F.; R. HASS; GUIM, T.N.; FISCHER, G.; VARGAS, G.D.; VIDOR, T.; S.O. HÜBNER. Serum survey for antibodies to coronavirus, herpesvirus, calicivirus, and parvovirus in domestics cats from Rio Grande do Sul, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 61, n. 3. 2009.

KEELING, C.L. Planning bovine viral diarrhea virus vaccination programs. **Veterinary Medicine**. v.91, n.9, p.873-877, 1996.

KENNEDY, M. A. Feline Infectious Peritonitis. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**. v. 50, n. 5, p. 1001–1011, 2020.

KENNEDY, M. A.; ABD-ELDAIM, M.; ZIKA, S. E.; MANKIN, J. M.; KANIA, S. A. Evaluation of antibodies against feline coronavirus 7b protein for diagnosis of feline infectious peritonitis in cats. **American Journal of Veterinary Research**. v. 69, n. 9, p. 1179-1782, 2008.

KIPAR, A.; BELLMANN, S.; KREMENDAHL, J.; KÖHLER, K.; REINACHER, M. Cellular composition, coronavirus antigen expression and production of specific antibodies in lesions in feline infectious peritonitis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v. 65, n. 2-4, p. 243–257. 1998.

KIPAR, A.; MAY, H.; MENDER, S.; WEBER, M.; LEUKERT, W.; REINACHER, M. Morphologic features and development of granulomatous vasculitis in feline infectious peritonitis. *Veterinary pathology*, 42(3), 321–330. 2005.

KIPAR, A.; MELI, M. L. Feline Infectious Peritonitis: Still an Enigma?. **Veterinary Pathology**. v. 51, n. 2, p. 505-526. 2014.

KUMMROW, M.; MELI, M. L.; HAESSIG, M.; GOENCZI, E.; POLAND, A.; PEDERSEN, N. C.; HOFMANN-LEHMANN, R.; LUTZ, H. Feline coronavirus serotypes 1 and 2: seroprevalence and association with disease in Switzerland. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**. v. 12, n. 10, p. 1209–1215. 2005.

LEWIS, C. S.; PORTER, E.; MATTHEWS, D.; KIPAR, A.; TASKER, S.; HELPS C. R.; SIDDELL, S. G. Genotyping coronaviruses associated with feline infectious peritonitis. **The Journal of general virology**. v. 96, p. 1358–1368, 2015.

LICITRA, B. N.; MILLET, J. K.; REGAN, A. D.; HAMILTON, B. S.; RINALDI, V. D.; DUHAMEL, G. E.; WHITTAKER, G. R. Mutation in spike protein cleavage site and pathogenesis of feline coronavirus. *Emerg Infect Dis.* **Emerging Infectious Diseases**. v. 19, n. 7, p. 1066-1073, 2013.

LONGSTAFF, L.; PORTER, E.; CROSSLEY, V. J.; HAYHOW, S. E.; HELPS, C. R.; TASKER, S. Feline coronavirus quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction on effusion samples in cats with and without feline infectious peritonitis. **Journal of Feline Medicine and Surgery**. v.19, n.2, p. 240–245. 2017.

LOVATO, L. T.; DEZENGRINI, R. Coronaviridae In: FLORES, E. F. **Virologia Veterinária. Virologia Geral e Doenças Víricas**. Santa Maria: UFSM. v. 3, e. 3, c. 25, p. 624-626, 2017.

LOWE, J. W. E., BRUCE, A. Genetics without genes? The centrality of genetic markers in livestock genetics and genomics. **History and Philosophy of the Life Sciences**. v. 41, n. 50, p 1-29, 2019.

MASTERS, P. S.; PERLMAN, S. Coronaviridae In: **Fields Virology**. KNIPE, D. M., HOWLEY, P. M., EDS.; LIPPINCOT WILLIAMS; WILKINS. Philadelphia, USA. v. 1, n.6, p. 825–858. 2013.

MELI, M.; KIPAR, A.; MÜLLER, C.; JENAL, K.; GÖNCZI, E.; BOREL, N.; GUNN-MOORE, D.; CHALMERS, S.; LIN, F.; REINACHER, M.; LUTZ, H. High viral loads despite absence of clinical and pathological findings in cats experimentally infected with feline coronavirus (FCoV) type I and in naturally FCoV-infected cats. **Journal of Feline Medicine and Surgery**. v. 6, n. 2, p. 69–81, 2004.

MILLER, W. A; KOEV, G. Synthesis of subgenomic RNAs by positive-strand RNA viruses. **Virology**. v. 273, n. 1, p. 1–8. 2000.

MURPHY, B. G.; PERRON, M.; MURAKAMI, E.; BAUER, K.; PARK, Y.; ECKSTRAND, C.; LIEPNIEKS, M.; PEDERSEN, N. C. The nucleoside analog GS-441524 strongly inhibits feline infectious peritonitis (FIP) virus in tissue culture and experimental cat infection studies. **Veterinary Microbiology**. v. 219, p. 226-233, 2018.

MYRRHA, L.; SILVA, F.; VIDIGAL, P.; RESENDE, M.; BRESSAN, G. C.; FIETTO, J.; SANTOS, M. R.; SILVA, L.; ASSAO, V. S.; SILVA, A.; DE ALMEIDA, M. R. Feline coronavirus isolates from a part of Brazil: insights into molecular epidemiology 5 and

phylogeny inferred from the 7b gene. **The Journal of Veterinary Medical Science**. 2019.

PEDERSEN, N. C. An update on feline infectious peritonitis: Virology and immunopathogenesis. **The Veterinary Journal**. v. 201, n. 2, p. 123–132. 2014.

PEDERSEN, N. C.; PERRON, M.; BANNASCH, M.; MONTGOMERY, E.; MURAKAMI, E.; LIEPNIEKS, M.; LIU H. Efficacy and safety of the nucleoside analog GS-441524 for treatment of cats with naturally occurring feline infectious peritonitis. **Journal of Feline Medicine and Surgery**. v. 21, n. 4, p. 271–281, 2019.

PEDERSEN, N. C.; LIU, H.; DURDEN, M.; LYONS, L. A. NATURAL resistance to experimental feline infectious peritonitis virus infection is decreased rather than increased by positive genetic selection. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v. 171, p. 17–20, 2016.

PEDERSEN, N. C.; LIU, H.; DODD, K. A.; PESAVENTO, P. A. Significance of coronavirus mutants in feces and diseased tissues of cats suffering from feline infectious peritonitis. **Viruses**. v. 1, n. 2, p. 166–184, 2009.

PRATELLI, A. Comparison of serologic techniques for the detection of antibodies against feline coronaviruses. **Journal of Veterinary Diagnostic and Investigation**. v. 20, n. 1, p. 45–50, 2008.

RIEMER, F.; KUEHNER, K. A.; RITZ, S.; SAUTER-LOUIS, C.; HARTMANN, K. Clinical and laboratory features of cats with feline infectious peritonitis--a retrospective study of 231 confirmed cases (2000-2010). **Journal of Feline Medicine and Surgery**. v. 18, n. 4, p. 348–356, 2016.

RISSI D. R. A retrospective study of the neuropathology and diagnosis of naturally occurring feline infectious peritonitis. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians**. v. 30, n. 3, p. 392–399. 2018.

ROTTIER, P. J. M.; NAKAMURA, K.; SCHELLEN, P.; VOLDERS, H.; HAIJEMA, B. J. Acquisition of Macrophage Tropism during the Pathogenesis of Feline Infectious Peritonitis Is Determined by Mutations in the Feline Coronavirus Spike Protein. **Journal of Virology**. v. 79, n. 22, p. 14122–14130, 2005.

SHERDING, R. G. Peritonite Infecciosa Felina. In: BIRCHARD, S. J; SHERDING, R. G. Manual Saunders: clínica de pequenos animais. 2. ed. São Paulo: Roca, 2003. p.101 - 107.

SIMONS, F. A.; VENNEMA, H.; ROFINA, J. E.; POL, J. M.; HORZINEK, M.C.; ROTTIER, P. J.; EGBERINK, H. F. A mRNA PCR for the diagnosis of feline infectious peritonitis. **Journal of Virological Methods**. v. 124, n. 1–2, p. 111–116, 2005.

STONE, A. E.; BRUMMET, G. O.; CAROZZA, E. M.; KASS, P. H.; PETERSEN, E. P.; SYKES, J.; WESTMAN, M. E. 2020 AAHA/AAFP Feline Vaccination Guidelines. **Journal of Feline Medicine and Surgery**. v. 22, n. 9, p. 813–830. 2020.

STOUT, A. E.; ANDRÉ, N. M.; WHITTAKER, G. R. Feline Coronavirus and Feline Infectious Peritonitis in Nondomestic Felid Species. **Journal of Zoo and Wildlife medicine: Official Publication of the American Association of Zoo Veterinarians**. v. 52, n. 1, p. 14–27. 2021.

STRANIERI, A.; SCAVONE, D.; PALTRINIERI, S.; GIORDANO, A.; BONSEMBIANTE F.; FERRO, S.; GELAIN, M. E.; MEAZZI, S.; LAUZI S. Concordance between Histology, Immunohistochemistry, and RT-PCR in the Diagnosis of Feline Infectious Peritonitis. **Pathogens**. V. 9, n. 10, p. 852, 2020.

TAKANO, T.; AKIYAMA, M.; DOKI, T.; HOHDATSU, T. Antiviral activity of itraconazole against type I feline coronavirus infection. *Veterinary Research*. v. 50, n.1, p. 5, 2019.

TAKANO, T.; HOHDATSU, T.; HASHIDA, Y.; KANEKO, Y.; TANABE, M.; KOYAMA, H. A “possible” involvement of TNF-alpha in apoptosis induction in peripheral blood lymphocytes of cats with feline infectious peritonitis. **Veterinary Microbiology**. v. 119, n. 2–4, p. 121–131, 2007.

TEKES, G.; HOFMANN-LEHMANN, R.; STALLKAMP, I.; THIEL, V.; THIEL, H. J. Genome Organization and Reverse Genetic Analysis of a Type I Feline Coronavirus. **Journal of Virology**. v. 82, n. 4, p. 1851–1859, 2008.

TEKES, G.; THIEL, H. J. Feline Coronaviruses: Pathogenesis of Feline Infectious Peritonitis. In: **Advances In Virus Research**. Academic Press Inc., 2016. v. 96, p. 193–218.

THIEL, V.; THIEL, H.; TEKES, G. Tackling feline infectious peritonitis via reverse genetics. **Bioengineered Bugs**. v. 5, n. 6, p. 396–400, 2015.

VAN HAMME, E.; DESMARETS, L.; DEWERCHIN, H. L.; NAUWYNCK, H. J. Intriguing interplay between feline infectious peritonitis virus and its receptors during entry in primary feline monocytes. **Virus Research**. v. 160, n. 1–2, p. 32–39, 2011.

VAN VLIET, A. L.; SMITS, S. L.; ROTTIER, P. J.; DE GROOT, R. J. Discontinuous and non-discontinuous subgenomic RNA transcription in a nidovirus. **The EMBO Journal**. v.21, n. 23, p. 6571–6580. 2002.

VENNEMA, H.; POLAND, A.; FOLEY, J.; PEDERSEN, N. C. Feline infectious peritonitis viruses arise by mutation from endemic feline enteric coronaviruses. *Virology*. v. 243, n. 1, p. 150–157. 1998.

WANG, Y.; SU, B., HSIEH, L. ; CHUEH, L. An outbreak of feline infectious peritonitis in a Taiwanese shelter: epidemiologic and molecular evidence for horizontal transmission of a novel type II feline coronavirus. **Veterinary Research**. v. 44, n. 57, 2013.

ZADRA, V. F. Validação e aplicação da RT-QPCR de RNAm codificantes de citocinas em gatos naturalmente infectados pelo coronavírus felino (FCOV). 66f. 2013. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Botucatu. 2013.

ZHAO, G.; SHI, S.Q.; YANG, Y.; PENG, J.P. M and N proteins of SARS coronavirus induce apoptosis in HPF cells. **Cell Biology and Toxicology**. v. 22, n. 5, p. 313–322. 2006.

ZOIA, A.; SLATER, L. A.; HELLER, J.; CONNOLLY, D. J.; CHURCH, D. B. A new approach to pleural effusion in cats: markers for distinguishing transudates from exudates. **Journal of Feline Medicine and Surgery**. v. 11, n. 10, p. 847–855, 2009.

## **Anexos**

## ANEXO A – Aprovação da Comissão de Ética e Experimentação Animal



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

PARECER Nº  
PROCESSO Nº

64/2020/CEEA/REITORIA  
23110.010790/2020-41

Certificado

Certificamos que a proposta intitulada “**Identificação e caracterização molecular de coronavírus em animais de companhia e em morcegos e roedores que coabitam espaços com humanos**”, registrada com o nº 23110.010790/2020-41, sob a responsabilidade de Silvia de Oliveira Hübner - 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 15 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 **03 de junho de 2020**.

Finalidade	( x ) Pesquisa ( ) Ensino
Vigência da autorização	10/06/2020 a 30 /12 /2023
Espécie/linhagem/raça	<i>Felis domesticus</i> <i>Canis lupus familiaris</i> <i>Tadarida brasiliensis</i> <i>Mus musculus</i> <i>Rattus norvegicus</i> <i>Rattus rattus</i>
Nº de animais	<i>Felis domesticus</i> - 114 <i>Canis lupus familiaris</i> - 114 <i>Tadarida brasiliensis</i> - 72 <i>Mus musculus</i> - 60 <i>Rattus norvegicus</i> - 60 <i>Rattus rattus</i> - 60
Idade	Variável
Sexo	Machos e Fêmeas
Origem	Cães e Gatos - Animais com tutores, em suas propriedades <i>Tadarida brasiliensis</i> - redes de neblina (mist nets) e armadilhas de harpa (harp trap) Roedores - ratoeira do tipo gangorra SISBIO 75148



## ANEXO A – Aprovação da Comissão de Ética e Experimentação Animal

Código para cadastro nº CEEA 10790-2020

---

**M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix**

*Presidente da CEEA*




Documento assinado eletronicamente por **ANELIZE DE OLIVEIRA CAMPELLO FELIX, Médico Veterinário**, em 10/06/2020, às 16:04, 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](http://sei.ufpel.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **0973157** e o código CRC **CAC7E104**.

## ANEXO B – Laudo histopatológico (Gato 1)

	<h1>Laudo Anatomopatológico</h1>	Página 1 de 2
		<b>ID SOVET: 210172</b>

**Paciente:** Sequinha ID Clínica: NI-cód2415 Entrada: 13/08/2021  
 Espécie: Felino Ra: RD Emissão: 16/09/2021  
 Sexo: Fêmea Idade: 6 ID SOVET prévia: Não consta  
 Material enviado: Cadáver Data do óbito: 12/08/2021  
**Tutor(a)** Rosimeri pte. Sequinha  
**Veterinário(a):** Ana Carolina Scariot **Clínica** NI

**Histórico:** Paciente Felv +, apresentava efusão abdominal e torácica, diarreia, inapetência. Análise de líquido com mais de 90 mil leucócitos, sendo maior parte neutrófilos e teste de rivalta positivo.

**Macroscopia:** Cadáver em estado corporal bom. Tricotomia em membros torácicos e região abdominal.  
 Ausência do olho esquerdo. Hematoma na orelha esquerda.  
 Líquido amarelado viscoso na cavidade abdominal e líquido avermelhado na cavidade torácica Presença de fibrina na serosa do intestino e omento.  
 Pâncreas esbranquiçado e aumento de volume. Baço com pontos esbranquiçados na superfície capsular.  
 Intestino com fezes branco-amareladas em todas as porções. Estômago com conteúdo alimentar esbranquiçado.  
 No lobo hepático lateral esquerdo, presença área irregular esbranquiçada e pequenos ponto esbranquiçados por toda superfície.  
 Rins esquerdos avermelhado com áreas irregulares.  
 Pulmão, lobo caudal direito com pregas na superfície.  
 Bile espessa.

### Microscopia / Diagnóstico Morfológico (DM):

A: Fígado : Infiltrado inflamatório predominante de macrófagos , linfócitos e fibrina -Hepatite fibrinogranulomatosa  
 B: Intestino,:Infiltrado inflamatório predominante de macrófagos, linfócitos e fibrina- Enterite fibrinogranulomatosa  
 Estômago: sem alterações  
 linfonodo: Depleção linfóide acentuada  
 omento : Infiltrado inflamatório predominante de macrófagos e linfócitos e fibrina -Serosite fibrinosa  
 C: Rins, Infiltrado inflamatório predominante de macrófagos e linfócitos e fibrina: Nefrite fibrinogranulomatosa  
 baço:Infiltrado inflamatório predominante de macrófagos e linfócitos  
 D: Adrenais: sem alterações  
 pulmão: Edema pulmonar abundante  
 E: Coração e encéfalo sem alterações

**Processamento Especial:** x-x-x-x-x

### Diagnóstico:

A:	Hepatite	Fígado
B:	Enterite catarral	Intestino
B1:	Serosite granulomatosa	Cavidade abdominal



**ANEXO B – Laudo histopatológico Felina (Gato 1)**



**Laudo Anatomopatológico**

Página 2 de 2

**ID SOVET: 210172**

**Comentário** X-X-X-X-X**Patologista Responsável:** Fabiane Borelli Grecco

O presente laudo anatomopatológico está alicerçado na discriminação detalhada do material a ser examinado, na história clínica e exames complementares de posse do Veterinário Assistente. Essas informações devem ser disponibilizadas ao Veterinário Patologista. Em caso de discordância clínico/patológica, deve o Veterinário Assistente solicitar ao Veterinário Patologista a revisão do caso, antes da definição da conduta terapêutica. Se for o caso, técnicas mais acuradas de diagnóstico poderão ser demandadas.

