

## **DETECÇÃO MOLECULAR DE CORONAVÍRUS FELINO EM GATOS DOMÉSTICOS NO MUNICÍPIO DE PELOTAS-RS**

**WELLINGTON DA SILVA<sup>1</sup>; ANA CAROLINA DE ASSIS SCARIOT<sup>2</sup>; LEONARDO CLASEN RIBEIRO<sup>3</sup>; WINNIE OLIVEIRA DOS SANTOS<sup>4</sup>; RENATA NOBRE DA FONSECA<sup>5</sup>; SÍLVIA DE OLIVEIRA HÜBNER<sup>6</sup>**

<sup>1</sup>*Universidade Federal de Pelotas – wellingtondasilva.ws@gmail.com*

<sup>2,3,4,5</sup>*Universidade Federal de Pelotas – carolinascariot@live.com<sup>2</sup>; leo\_clasen92@hotmail.com<sup>3</sup>; winnie-oliveira@hotmail.com<sup>4</sup>; renatanobredafonseca@gmail.com<sup>5</sup>*

<sup>6</sup>*Universidade Federal de Pelotas – silviaohubner@gmail.com*

### **1. INTRODUÇÃO**

O coronavírus felino (FCoV) pertence à família *Coronaviridae*, gênero *Alpha-coronavirus*, espécie *Alphacoronavirus 1* (ICTV, 2019). Em sua estrutura encontra-se uma molécula de RNA simples e de sentido positivo, com um tamanho aproximado de 29 kB (PEDERSEN et al., 2009). O seu complexo processo de replicação, envolvendo transcrição descontínua, lhe confere alta taxa de mutação (MILLER; KOEV, 2000).

O FCoV possui a capacidade de infectar o sistema digestório de felinos domésticos e selvagens. A depender de sua forma patogênica, é possível ser classificado em dois biótipos: o coronavírus entérico felino (FECV) e o vírus da peritonite infecciosa felina (FIPV). O FECV pode causar quadros de diarreia ou assintomáticos, sendo extremamente contagioso (PEDERSEN, 2009). O FIPV é uma modificação do FECV, por mecanismos ainda não esclarecidos, que leva ao aparecimento da peritonite infecciosa felina (PIF). A PIF constitui uma enfermidade que afeta vários órgãos, principalmente da cavidade abdominal, e apresenta uma elevada mortalidade. A doença apresenta duas formas distintas: forma efusiva (efusão abdominal) e forma não efusiva (HARTMANN, 2005).

A identificação da presença do FCoV pode ser realizada através da técnica molecular RT-PCR (*Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction*), ou métodos sorológicos (FLORES, 2017).

Dada a nítida importância do FCoV à medicina veterinária no que diz respeito à clínica de felinos, esse trabalho, através de detecção por RT-PCR, teve por objetivo estudar a ocorrência do FCoV na população de felinos domésticos no município de Pelotas, na região sul do Rio Grande do Sul.

### **2. METODOLOGIA**

#### **Coleta de amostras e processamento**

Foram coletados *swabs* retais, órgãos (intestino delgado, omento, linfonodos mesentéricos, baço, rim e fígado), sangue total, efusão torácica e abdominal de 77 gatos assintomáticos (n=12) e sintomáticos (n=65). Os *swabs* foram armazenados em meio de transporte (RNA/*later*<sup>TM</sup> Stabilization Solution) e conservados sob temperatura de - 80 °C. Os órgãos, sangue total e efusão abdominal, foram estocados a - 80 °C até o processamento. Todas as amostras (total de 86) foram coletadas no município de Pelotas, Rio Grande do Sul.

### **Extração do RNA viral e síntese de DNA complementar (cDNA)**

A extração e purificação do RNA das amostras foram realizadas pelo kit comercial Bio Gene Extração de DNA/RNA Viral. A síntese do cDNA foi realizada após a extração do RNA viral, através do kit comercial High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit da Applied Biosystems™. Ambos foram realizados segundo recomendações dos fabricantes.

### **Técnica de RT-PCR**

Inicialmente, realizou-se a técnica de *semi-nested* RT-PCR teve como alvo a detecção de segmento do gene que codifica a proteína M, possibilitando a detecção de um amplo espectro de coronavírus. Na primeira rodada, em um microtubo de 200 µl, foram adicionados 12,5 µl de 1x GoTaq® Colorless Master Mix , 1 microlitro(10 picomol) do *primer* senso CCV1, 1 microlitro (10 picomol) de *primer* anti-senso CCV2, 3 µl do cDNA obtido e 7,5 µl de água livre de RNase, totalizando 25 µl. Foram utilizadas como controle positivo amostras contendo CCoV provenientes do Laboratório de Virologia e Imunologia da UFPel (LabVir) e, para o controle negativo, água livre de RNase em substituição ao cDNA. Todos os tubos foram introduzidos em um termociclador, configurado para realizar ciclos nas seguintes condições: 95°C por 7 minutos; 35 ciclos de 94°C (1 minuto), 55°C (1 minuto), 72°C (1 minuto); e 72° por 7 minutos. A segunda rodada utilizou o *primer* senso CCV3 e o anti-senso CCV2, e 3 µl do produto da rodada anterior diluídos em 1:10, sendo submetidos às mesmas condições anteriores do termociclador. A técnica foi baseada em PRATELLI et al. (1999) com modificações.

Os produtos obtidos da segunda rodada do *semi-nested* de RT-PCR foram submetidos a uma eletroforese a 80 volts, com gel de agarose a 2%. Para leitura, o gel foi imerso em solução de brometo de etídio e exposto a uma luz ultravioleta para visualização. Os *amplicons* esperados tinham um tamanho de 220 pb.

*Primers* iniciadores utilizados na *semi-nested* RT-PCR para a detecção de coronavírus genérico (descritos por PRATELLI et al. 1999)

<b>Primers</b>	<b>Orientação</b>	<b>Sequência (5'-3')</b>	<b>Posição</b>	<b>Tamanho do fragmento</b>
CCV1	Senso	TCCAGATATGTAATGTCGG	337–356	
CCV2	Anti-senso	TCTGTTGAGTAATCACCAGCT	726–746	409bp
CCV3	Senso	GGTGTCACTCTAACATTGCTT	535–556	230pb

Para detectar, futuramente, mutações na região S do genoma, as amostras consideradas positivas neste RT-PCR foram submetidas a outro RT-PCR, segundo DECARO et al. (2021), com modificações. Para detecção do FCoV tipo I, utilizou-se os *primers* UCD5F (senso) UCD3248R (anti-senso); para o FCoV tipo II, os *primers* G2F (senso) e G2R (anti-senso). Foram utilizados microtubos de 200 µl, adicionando 12,5 µl de 1x GoTaq® Colorless Master Mix, 1 microlitro (10 picomol) de *primer* senso e 1 microlitro (10 picomol) de *primer* anti-senso, 7,5 µl de água livre de RNase e 3 µl de amostra, totalizando 25 µl. Foram utilizadas como controle positivo amostras contendo os vírus provenientes do LabVir e, para o controle negativo, água livre de RNase em substituição ao cDNA. Após, foram colocados num termociclador nas seguintes condições: 94°C por 5 minutos; 45 ciclos de 94°C (30 segundos), 50°C (30 segundos), 68°C (45 segundos); e 72°C por 10 minutos. Após

eletroforese a 80 volts em gel de agarose a 2%, o gel foi submerso em solução de brometo de etídio e exposto a luz ultravioleta para leitura. *Amplicons* de amostras com FCoV tipo I tinham tamanho esperado de 215 pb e os do tipo II de 250 pb.

*Primers* utilizados na RT-PCR específica para a região *spike* do FCoV (descritos por DECARO et al., 2021)

<b>Primers</b>	<b>Orientação</b>	<b>Sequência (5'-3')</b>	<b>Posição</b>	<b>Tamanho do fragmento</b>
UCD5F	Senso	GCCCAATATTACAATGGCATAA	26440-26461	
UCD3248 R	Anti-Senso	AAGGCATTAGCAAGTATTTC	23637-23657 <sup>a</sup>	215bp
G2F	Senso	TAGGTGCACTTGGTGGTGGT	23247-23265	
G2R	Anti-Senso	GCATTGCAAGTGAAAACAA	23777-23496	250bp

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 77 gatos, em 20 (25,97%) foi detectada a presença do FCoV, quando realizado a técnica de PCR com primers que permitem a detecção da região M do genoma viral (PRATELLI et al. 1999). Destes, 16 (20,78 %) tiveram amostras positivas na PCR que identifica a região S do genoma viral (DECARO et al, 2021)..

Em relação às 86 amostras, 26 (30,23 %) resultaram positivo na metodologia de PRATELLI et al (1999). Ao serem submetidas a PCR descrita por DECARO et al (2021), 21 foram positivas, sendo que 4 eram do baço, efusão abdominal, linfonodos mesentéricos, e omento; 2 de efusão abdominal e sangue de um animal; 2 de um *swab* retal e sangue de um mesmo animal; 2 de efusão abdominal; 1 de uma efusão torácica; 10 de *swab* retal.

Segundo CHANG et al (2012), a região que codifica a proteína *Spike*, apresenta alta taxa de mutação, sendo responsável pelo tropismo e virulência do FCoV. Isso pode explicar o fato de 4 amostras (provenientes de 4 animais) serem negativas na técnica de PCR desenvolvida por DECARO et al (2021), a qual tem como alvo a região citada, sendo que ambas foram positivas na PCR descrita por PRATELLI et al (1999), que amplifica a região M. Com finalidade de estudar possíveis mutações, futuramente, realizar-se-á o sequenciamento dos *amplicons* obtido na PCR com alvo na região S.

A detecção em baço, linfonodos intestinais e omento em animais com indicativo de infecção por FIPV são respaldados pela literatura, a qual aponta alta carga viral nesses locais (PEDERSEN, 2014). A detecção em *swab* retal, constatada em 7 dos 11 animais que apresentavam diarreia, é sinal indicativo de eliminação do FECV nas fezes, principal fonte de disseminação do vírus, corroborando com outros estudos (BUBENIKOVA et al. 2020).

Em animais com sinais de PIF e que foram detectados FCoV em órgãos, tecidos, sangue e efusão, não foi possível identificar a presença do vírus nas amostras de *swabs* retais, o que confirma dados relatados (CHANG et al. (2012) e PEDERSEN et al. (2009), que apontam nula ou baixa excreção de FIPV nas fezes.

### 4. CONCLUSÕES

O trabalho, ao cumprir sua proposta inicial, revela-se de suma importância para o desenvolvimento científico, uma vez que demonstra a presença do FCoV em felinos domésticos no município de Pelotas.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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.
- 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.
- DECARO, N.; MARI, V.; LANAVE, G.; LORUSSO, E.; LUCENTE, M. S.; DESARIO, C.; COLAIANNI, M. L.; ELIA, G.; FERRINGO, F.; ALFANO, F.; BUONAVOGGLIA, 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.
- FLORES, E. F. **Virologia Veterinária. Virologia Geral e Doenças Víricas**. Santa Maria: UFSM. v. 3, e. 3, c. 25, p. 885, 2017.
- HARTMANN, K. Feline Infectious Peritonitis. **Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice**. v. 35, p. 39–79, 2005.
- International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). **Coronaviridae**. 2019. Acessado em 12 de agosto de 2022. Disponível em: [https://ictv.global/report\\_9th/RNAPos/Nidovirales/Coronaviridae](https://ictv.global/report_9th/RNAPos/Nidovirales/Coronaviridae)
- MILLER, W. A; KOEV, G. Synthesis of subgenomic RNAs by positive-strand RNA viruses. **Virology**. v. 273, n. 1, p. 1–8. 2000.
- Pedersen, N.C. An update on feline infectious peritonitis: Virology and immunopathogenesis. **Veterinary Journal**. v. 201. p. 123–132, 2014.
- 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., Tempesta, M., Greco, G., Martella, V., Buonavoglia, C. Development of a nested PCR assay for the detection of canine coronavirus. **Journal of Virological Methods**. v. 80, n. 1, 1999.
- 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.