

ALINE SANTANA DA HORA

**Diversidade gênica do coronavírus felino em populações virais  
entéricas e sistêmicas intra e inter-hospedeiros**

São Paulo  
2014

ALINE SANTANA DA HORA

**Diversidade gênica do coronavírus felino em populações virais  
entéricas e sistêmicas intra e inter-hospedeiros**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

**Departamento:**

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

**Área de concentração:**

Epidemiologia Experimental  
Aplicada às Zoonoses

**Orientador:**

Prof. Dr. Paulo Eduardo Brandão

São Paulo  
2014

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

#### DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínia Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da  
Universidade de São Paulo)

T.2932  
FMVZ

Hora, Aline Santana da  
Diversidade gênica do coronavírus felino em populações virais entéricas e sistêmicas  
intra e inter-hospedeiros / Aline Santana da Hora. -- 2014.  
69 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e  
Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo,  
2014.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Eduardo Brandão.

1. Coronavírus felino. 2. Vírus da peritonite infecciosa felina. 3. Coronavírus entérico felino.  
4. Peritonite infecciosa felina. 5. Felinos domésticos. I. Título.

---

ERRATA

**HORA, A.S. Diversidade gênica do coronavírus felino em populações virais entéricas e sistêmicas intra e inter-hospedeiros. 2014. 82 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.**

Página	Onde se lê	Leia-se
RESUMO	82 f	69 f.
ABSTRACT	82 f	69 f

---



São Paulo, 25 de janeiro de 2014  
CEUA N 2055211113

Ilmo(a). Sr(a).  
Pesquisador(a): Aline Santana Da Hora  
Executante: Aline Santana da Hora  
Depto/Disc: Departamento De Medicina Veterinária Preventiva E Saúde Animal  
Paulo Eduardo Brandão (orientador)

Título do projeto: "Análise multigênica das quasiespécies do coronavírus felino em felinos com peritonite infecciosa felina".

#### **Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais FMVZ/USP**

O vírus da peritonite infecciosa felina (FIPV) emerge por mutações do coronavírus entérico (FECoV). A peritonite infecciosa felina (PIF) é uma doença sistêmica, imunemediada e progressivamente fatal que acomete os felinos domésticos e selvagens. A diferenciação entre FIPV e FECoV é um aspecto diagnóstico crítico da infecção pelos coronavírus felinos (FCoVs). Estudos multigênicos em quasiespécies do vírus da PIF são essenciais para fornecer informações que auxiliarão no entendimento da patogenia da PIF e no desenvolvimento de métodos diagnósticos mais precisos. O presente estudo tem por objetivo avaliar as mutações observadas em quasiespécies virais obtidas de animais infectados pelo FCoV. Amostras de órgão obtidas de animais necropsiados serão submetidas à PCR para o RNAm dos FCoVs para confirmar a presença dos FCoVs. Amostras positivas de dois diferentes órgãos de 20 gatos com PIF serão clonadas em bactérias competentes e em seguida serão selecionados no mínimo 12 clones para o estudo da diversidade viral das quasiespécies intra e inter hospedeiros. Adicionalmente, amostras de fezes e de intestino proveniente de 10 gatos sem alterações macroscópicas sugestivas de PIF serão incluídas no estudo. Serão pesquisados marcadores moleculares para a diferenciação entre FIPV e FECoV, nos genes E, M, N, 3 e 7 por meio do sequenciamento. As sequências de nucleotídeos obtidas serão comparadas geneticamente entre si e entre aquelas disponíveis em bancos de dados genéticos.

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, na reunião de 16/01/2014, **ANALISOU** e **APROVOU** todos os procedimentos apresentados neste protocolo.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do protocolo.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do protocolo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.
4. **Relatórios parciais** de andamento deverão ser enviados **anualmente** à CEUA até a conclusão do protocolo.

Atenciosamente,

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni  
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

## FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: HORA, Aline Santana da

Título: Diversidade gênica do coronavírus felino em populações virais entéricas e sistêmicas intra e interhospedeiros

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

### Banca Examinadora

Prof. Dr.: \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr.: \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr.: \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr.: \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr.: \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

“I know. I know.  
they are limited, have different  
needs and  
concerns.

but I watch and learn from them.  
I like the little they know,  
which is so  
much.

they complain but never  
worry,  
they walk with a surprising dignity.  
they sleep with a direct simplicity that  
humans just can't  
understand.

their eyes are more  
beautiful than our eyes.  
and they can sleep 20 hours  
a day  
without  
hesitation or  
remorse.

when I am feeling  
low  
all I have to do is  
watch my cats  
and my  
courage  
returns.

I study these  
creatures.

they are my  
teachers.”

-Charles Bukowski, *My Cats*

“Se pensarmos pequeno... Coisas pequenas teremos...  
Mas se desejarmos fortemente o melhor e, principalmente, lutarmos pelo  
melhor... O melhor vai se instalar em nossa vida.  
Porque sou do tamanho daquilo que vejo, e não do tamanho da minha altura.”  
**Carlos Drummond de Andrade**

À minha mãe, *Nair*, que por sua força e amor me conduziu pela vida.

“Enquanto não superarmos a ânsia do amor sem limites, não podemos crescer  
emocionalmente. Enquanto não atravessarmos a dor de nossa própria solidão,  
continuaremos a nos buscar em outras metades. Para viver a dois, antes, é  
necessário ser um.”  
**Fernando Pessoa**

Ao meu amor, *Moacyr*, por ser meu ponto de equilíbrio.



## **Agradecimentos**

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** pela concessão da bolsa de doutorado (Proc. 2009/17535-9) e do auxílio à pesquisa (Proc. 2010/07492-8).

Ao **Prof. Dr. Paulo Eduardo Brandão** por todos os ensinamentos e compreensão. Obrigada pela confiança.

À **Profa. Dra. Mitika K. Hagiwara** por estar sempre presente com seus sábios conselhos, os quais me fazem ver a outra face da moeda.

Ao **Prof. Dr. Leonardo José Richtzenhain** por ser um exemplo de sabedoria.

Ao **Prof. Dr. João Pessoa Araújo Júnior** e à **Andreza Figueiredo** por me acolherem no Laboratório de Diagnóstico Molecular, do Departamento de Microbiologia e Imunologia, IB – UNESP – Botucatu e pela oportunidade de convívio e aprendizado.

Aos médicos veterinários, residentes e funcionários do Hospital Veterinário-FMVZ-USP pelo suporte, em especial à **Vera Fortunato Wirthl** que sempre foi solícita em colaborar com os projetos.

Ao **Prof. Dr. Paulo Maiorka, Luciana Torres** e aos residentes do Departamento de Patologia - FMVZ - USP, em especial à **Juliana Guerra** e ao **Ramon Mesquita** pelo suporte “anatomohistopatológico”.

**Maria Helena Pelissari, Samantha Ive Miyashiro, Maria Luísa Franchini** e **Maiara Leme** que desde o mestrado estão ao meu lado como melhores amigas e parceiras de trabalho. Sem vocês essa longa jornada seria sem graça!

À **Helena Coelho** por ser a irmã que não tenho, por ser meu ombro amigo para todas as horas. Tenho certeza que nossa amizade será para sempre!

Às amigas **Paloma Tonietti** e **Carolina Torres Alejo** pela ajuda, parcerias e risadas.

Às amigas **Juliana Nogueira** e **Karen Asano** pelo apoio nas coletas e companheirismo.

À amiga **Kátia Barão Corgozinho** pelo suporte nas coletas, por ser um exemplo de pessoa e profissionalismo. Você sempre estará em meu coração.

À amiga **Clodine Valle** por me mostrar com palavras doces que somos mais fortes do que pensamos.

À minha amiga gaúcha **Quélin Vanaz** que sempre me acompanha, mesmo estando tão longe. Sua amizade é inestimável!

À **Sueli Akemi Taniwaki** pela amizade e apoio técnico fundamentais nos momentos finais deste estudo.

À **Dra. Hilda Pena** por todas as parcerias que com certeza contribuíram e contribuirão com aqueles que tanto amamos, os felinos.

Ao vizinho e amigo **Leandro Gustavo** pela convivência.

À **Sheila Silva** por toda dedicação e disposição em ajudar.

Aos (ex) pós-graduandos VPS: **Enio Mori, Fernanda Gonsales, Cíntia Favero, Iracema Barros, Katya Ono, Patrícia Filippsen, Luis Espinoza, João Fábio, Karen Ferrari, Eveline Zunino, Herbert Soares, Amalia Barbieri, Patrícia Moriconi, Estella Gallucci, Aline Cabral, Tatiana Ueno, Alessandra Castro** pela convivência agradável.

À **Betina Metzger** por me acolher em sua casa em Botucatu e tornar minha estada lá muito divertida.

Aos funcionários da secretária do VPS-FMVZ-USP, **Cris, Danival e Virginia** por todo auxílio e prontidão.

À todos os professores do VPS-FMVZ-USP por todo conhecimento transmitido.

Aos **Proprietários, Criadores e Veterinários** por gentilmente contribuírem com o estudo. Principalmente àqueles que no momento de luto, compreenderam a importância de doar seus animais em prol da ciência. Em especial, à **Karine Rangel** e **Willian Miguel** por cederem seus queridos, Arthur e Rebeca, que foram e serão fundamentais para os estudos dos coronavírus felino.

HORA, A.S. **Diversidade gênica do coronavírus felino em populações virais entéricas e sistêmicas intra e inter-hospedeiros.** [Intra and inter-host genic diversity of feline coronavirus in systemic and enteric viral populations]. 2014. 82 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

O coronavírus felino (FCoV) ocorre sob uma grande diversidade gênica de amostras e é classificado em dois patótipos: o coronavírus felino entérico (FECoV) e o vírus da peritonite infecciosa felina (FIPV). O patótipo FIPV é altamente virulento e responsável pelo desenvolvimento de uma doença altamente fatal, denominada de peritonite infecciosa felina (PIF). Já o FECoV apresenta-se amplamente disseminado na população felina e é responsável na maioria das vezes por infecção assintomática. Atualmente, nenhum marcador gênico conhecido é capaz de diferenciar os patótipos FECoV de FIPV. O presente estudo foi dividido em dois capítulos. No primeiro capítulo, objetivou-se avaliar a diversidade molecular do gene da membrana (M) em 190 amostras provenientes de 5 gatos sem manifestações de PIF (PIF-) e de 10 gatos com manifestações clínicas e histopatológicas de PIF (PIF+). Com esse estudo, concluiu-se que tanto a hipótese de mutação *in vivo* do FECoV para FIPV, quanto a hipótese de transmissão entre gatos do patótipo FIPV são plausíveis. No segundo capítulo, com o objetivo de avaliar a diversidade dos genes 3a-c, E e M foram sequenciados clones de *amplicons* para estes genes obtidos, de 6 gatos PIF+ e 2 gatos PIF-. Os genes 3a-c, E e M apresentaram diversidade gênica que confere a constituição das quasiespécies de coronavírus felino com probabilidade de emergência do patótipo de alta virulência, mas de um modo hospedeiro-específico. Com o segundo estudo, concluiu-se que as linhagens FIPV de coronavírus felino apresentaram a proteína 3c truncada, sendo o gene 3c o único marcador de patótipo dos FCoVs observado dentre os genes estudados.

Palavras-chave: Coronavírus felino. Vírus da peritonite infecciosa felina. Coronavírus entérico felino. Peritonite infecciosa felina. Felinos domésticos.

HORA, A.S. **Intra and inter-host genic diversity of feline coronavirus in systemic and enteric viral populations** [Diversidade gênica do coronavírus felino em populações virais entéricas e sistêmicas intra e inter-hospedeiros.]. 2014. 82 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Feline coronavirus (FCoV) occurs as a large genic diversity of strains and is classified as two pathotypes: feline enteric coronavirus (FECoV) and feline infectious peritonitis virus (FIPV). The FIPV pathotype is highly virulent and responsible for the onset of a highly fatal disease named feline infectious peritonitis (FIP), while the FECoV pathotype is widely disseminated in feline populations leading mostly to asymptomatic infections. No genic marker is currently known to differentiate the FECoV and FIPV pathotypes. This study has been divided in two chapters. In the first chapter, the aim was to evaluate the molecular diversity of the membrane (M) gene in 190 samples from 5 cats without FIP (FIP-) and 10 cats with clinical and histopathological evidence of FIP (FIP+). The conclusion of this study is that both the in vivo mutation hypothesis in the FECoV-to-FIP direction and the hypothesis of FIPV transmission amongst cats are plausible. In the second chapter, aimed to evaluate the diversity of genes 3a-c, E and M, clones of amplicons for these genes were obtained and sequenced from samples from six FIP+ and 2 FIP- cats. Genes 3a-c, E and M show a genic diversity that results in a quasispecies constitution of FCoV that leads to the probability of the emergence of the highly virulent pathotype in a host-specific way. The conclusion of this second study is that FIPV lineages show a truncated form of the 3C protein, making the 3c gene the only pathotype marker for FCoV observed amongst the genes studied herein.

Keywords: Feline coronavirus. Feline infectious peritonitis virus. Feline enteric coronavirus. Feline infectious peritonitis.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	18
	<b>Capítulo I. Intrahost diversity of feline coronavirus: a consensus between the circulating virulent/avirulent strains and the internal mutation hypotheses?</b> .....	19
<b>3</b>	<b>INTRODUCTION</b> .....	19
<b>4</b>	<b>MATERIALS AND METHODS</b> .....	21
4.1	Animals and sample collection .....	21
4.2	Total RNA extraction.....	21
4.3	RT-PCR for the detection of the FCoV mRNA of the membrane (M) gene.....	22
4.4	Partial M gene amplification and sequencing.....	22
4.5	Histopathologic analysis.....	23
<b>5</b>	<b>RESULTS</b> .....	24
5.1	RT-PCR for the detection of FCoV mRNA of the membrane gene .....	24
5.2	Partial M gene amplification, sequencing and phylogenic analysis.....	24
5.3	Histopathologic analysis.....	28
<b>6</b>	<b>DISCUSSION AND CONCLUSIONS</b> .....	30
	<b>Capítulo II - Proteína 3c do coronavírus felino: um candidato a marcador de virulência?</b> .....	33
<b>7</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	33
<b>8</b>	<b>Material e Métodos</b> .....	35
8.1	Animais e coleta de amostras .....	35
8.2	Extração de RNA.....	36
8.3	Detecção do RNA mensageiro do gene M dos FCoVs.....	36
8.4	Amplificação dos genes 3a-c, E e M dos FCoVs.....	38
8.5	Clonagem .....	39
8.6	Sequenciamento de DNA.....	40
8.7	Edição das sequências .....	41
8.8	Análises filogenéticas .....	42
<b>9</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	43

9.1	RT-PCR para a detecção do RNAm do gene M dos FCoV	43
9.2	Amplificação, sequenciamento e análise filogenética dos genes 3a-c, E e M	43
<b>10</b>	<b>DISCUSSÃO E CONCLUSÕES</b>	<b>53</b>
<b>11</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>58</b>
	<b>REFÊRENCIAS</b>	<b>59</b>
	<b>APÊNDICES</b>	<b>66</b>

## 1 INTRODUÇÃO

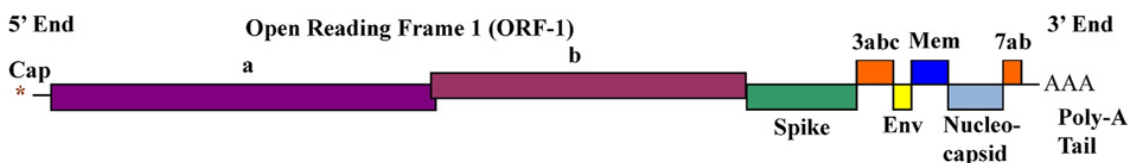
Os coronavírus causam doenças altamente prevalentes em animais domésticos e selvagens, além de acometerem seres humanos (LAI; HOLMES, 2001). O coronavírus felino (FCoV) ocorre sob uma grande diversidade de amostras, classificáveis em dois sorotipos (tipo I e II) e dois patótipos: o coronavírus entérico (FECoV) e o vírus da peritonite infecciosa felina (FIPV) (PEDERSEN; ALLEN; LYONS, 2008). O patótipo FECoV está amplamente disseminado na população de felinos domésticos e apresenta baixa virulência ocasionando, geralmente, infecções assintomáticas que podem evoluir para quadros diarreicos autolimitantes. Já o patótipo FIPV é altamente virulento e responsável pelo desenvolvimento de uma doença altamente fatal, denominada de peritonite infecciosa felina (PIF) (PEDERSEN, 2009). O sorotipo I apresenta distribuição mundial mais elevada (ADDIE et al., 2003). Sugere-se que o sorotipo II seja originado de uma recombinação entre FCoV tipo I e o coronavírus canino (HERREWEGH et al., 1998). O patótipo FIPV está presente tanto no sorotipo I quanto no II (PEDERSEN; ALLEN; LYONS, 2008).

Ambos FCoVs pertencem ao gênero *Alphacoronavirus*, da subfamília *Coronavirinae*, família *Coronaviridae*, da ordem *Nidovirales*, juntamente com o vírus da gastroenterite transmissível (TGEV), coronavírus respiratório suíno, coronavírus canino (CCoV) e coronavírus sorotipo 229E da bronquite humana (HCV 229E), constituindo a espécie *Alphacoronavirus I* (CARSTENS, 2010).

Os FCoVs são vírus envelopados, com genoma de RNA de fita simples, não segmentada, de polaridade positiva, composto por aproximadamente 29.000 nucleotídeos (PEDERSEN, 2009). Assim como os demais coronavírus e outros vírus RNA, os FCoVs se replicam por um mecanismo único, que resulta em uma alta diversidade genética devido à baixa fidelidade de sua polimerase e à elevada frequência de recombinação (LAI; HOLMES, 2001).

No genoma dos FCoVs (Figura 1), há 11 *open reading frames* (ORFs), incluindo uma replicase não-estrutural relacionada com duas grandes ORFs, quatro ORFs estruturais que codificam as proteínas estruturais (S, M, E e N) e cinco ORFs para proteínas acessórias (3a-c e 7a, b) (PEDERSEN, 2009).

Figura 1 - Figura esquemática da organização do genoma dos FCoV.



Fonte: Drechsler et al. (2011).

As proteínas estruturais que compõem os FCoV são a espícula (S), envelope (E), membrana (M) e nucleocapsídeo (N) (ADDIE; JARRETT, 2006). A proteína S, desempenha um papel central na biologia e patogênese da infecção por FCoV, incluindo ligação e fusão do vírus às células, indução de anticorpos neutralizantes e da imunidade celular (LAI; HOLMES, 2001; ROTTIER et al., 2005). A proteína M é a proteína estrutural mais abundante e apresenta funções importantes relacionadas à manutenção da estabilidade dos vírions e à elicitação de imunidade mediada por células (ROTTIER, 1995). Os vírions dos coronavírus possuem pouca quantidade de uma proteína pequena associada à membrana, a proteína E, que junto com a M é essencial para a formação da partícula viral. A proteína N apresenta-se intimamente associada com o genoma, conferindo certa proteção para o mesmo (CAVANAGH, 2005).

Estudos sugerem que as proteínas não estruturais dos genes 3a-c e 7a,b estejam relacionadas com a virulência das amostras de FCoV (VENNEMA et al., 1998), contudo as funções exatas destas proteínas não foram definidas (ADDIE; PALTRINIERI; PEDERSEN, 2004).

Evidências indicam que os dois patótipos são apenas variantes do mesmo vírus e que FIPV se origina do FECoV por mutações em um animal persistentemente infectado (VENNEMA et al., 1998; LICITRA et al., 2013). Contudo, a hipótese de que o FIPV circule como patótipo “pronto” entre gatos também é aceita (BROWN et al., 2009; HORA et al., 2013).

Até o presente momento, a mutação precisa que determina o patótipo FIPV é desconhecida (LICITRA et al., 2013). Diversos estudos atribuem a diferença de virulência entre os patótipos aos genes S (ROTTIER et al., 2005; REGAN et al., 2008; CHANG et al., 2012; LICITRA et al., 2013), 3a-c (VENNEMA et al., 1998;



CHANG et al., 2010; BALINT et al., 2012; PEDERSEN et al., 2012; HSIEH et al., 2013) e 7ab (HERREWEGH et al., 1995a; KENNEDY et al., 2001; DEDEURWAERDER et al., 2014).

Diferenças no tropismo celular justificam as diferentes manifestações clínicas da infecção por FCoV. FECoV apresenta tropismo pelo epitélio apical maduro dos vilos intestinais (PEDERSEN et al., 1981), replicando-se nos enterócitos causando diarreia ou infecção assintomática, enquanto que o FIPV replica-se em macrófagos, ocasionando infecção sistêmica e PIF.

A infecção por FCoV apresenta ampla distribuição nos felinos domésticos e também pode ser observada nos felinos selvagens. O FECoV está presente em todos os gatis e abrigos com mais de seis gatos e acomete aproximadamente 60% desses felinos (PEDERSEN, 2009), enquanto que a prevalência deste vírus é baixa em ambientes onde vive apenas um felino (HORZINEK; OSTERHAUS, 1979; ADDIE; JARRETT, 1992b; HERREWEGH et al., 1995b; ADDIE, 2000). Certos gatos podem permanecer soropositivos por 10 anos ou mais (ADDIE, et al., 2000), o que pode ser reflexo de infecções persistentes ou reinfecções (PEDERSEN et al., 2004).

A disseminação do FCoV ocorre pela via fecal-oral, a eliminação viral pelas fezes pode ocorrer por semanas após a exposição (PEDERSEN; ALLEN; LYONS, 2008), podendo ser transitória, recorrente ou crônica, ocorrendo por um período de meses ou anos (FOLEY et al., 1997; ADDIE et al., 2003; PEDERSEN; ALLEN; LYONS, 2008). O vírus é raramente encontrado na saliva de gatos saudáveis e desta maneira o compartilhamento de comedouros e bebedouros entre os felinos desempenha um papel de pouca importância (ADDIE; JARRETT, 2001). Assim como a transmissão transplacentária que é rara (ADDIE; JARRETT, 1990).

Aproximadamente um em nove dos felinos infectados com FCoV desenvolverá a PIF (ADDIE; JARRETT, 1992b; ADDIE et al., 1995), sendo que 70% dos casos ocorrem em gatos com menos de um ano de idade (HARTMANN, 2005). Entretanto, os felinos idosos e não castrados também apresentam alta susceptibilidade à PIF (PESTEANU-SOMOGYI; RADZAI; PRESSLER, 2006).

Em um ambiente com animais infectados com FCoV, a persistência de condições estressantes (como procedimentos cirúrgicos, mudanças de ambiente, coinfeções pelo vírus da imunodeficiência felina – FIV e/ou vírus da leucemia felina – FeLV), predispõem ao desenvolvimento da PIF (ADDIE et al., 2009). Em um

estudo, dentre 20 gatos positivos para FIV que foram infectados com FCoV, dois desenvolveram PIF. Em contraste, a mesma cepa inoculada em animais saudáveis não foi capaz de produzir a PIF em nenhum destes (POLAND et al., 1996). Adicionalmente, as condições estressantes aumentam em 10 a  $10^6$  vezes a quantidade de vírus que é eliminada pelas fezes (PEDERSEN et al., 2004).

Suspeita-se que o tipo e a intensidade da resposta imune do hospedeiro determinam o desfecho da infecção por FCoV. Os gatos que apresentam uma forte resposta imune mediada por células não desenvolvem a PIF. Enquanto que gatos com resposta predominantemente humoral e imunidade celular fraca ou inexistente progredem para a doença na forma efusiva, enquanto que uma resposta intermediária leva à PIF seca (PEDERSEN, 2009).

A minoria dos felinos infectados por FCoV apresenta diarreia transitória e leve (PEDERSEN, 1995a), em alguns casos ocorre apenas vômito e em outros, ambas as manifestações (ADDIE, 2012). Ocasionalmente, o vírus pode ser responsável por um curso grave agudo ou crônico de vômitos e/ou diarreia e perda de peso, que pode não responder aos tratamentos e durar meses. Raramente, o FCoV é fatal quando no patotipo nativo (KIPAR et al., 1998).

Não há testes específicos para diagnosticar a enterite por coronavírus. Um quadro de diarreia só pode ser creditado ao FCoV se for excluída qualquer outra causa de diarreia e se o animal apresentar anticorpos anti-FCoV ou resultado positivo na reação transcrição reversa seguida pela reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR) realizada em amostras fecais. As alterações histopatológicas observadas no intestino são inespecíficas e nesses casos, a infecção só pode ser confirmada por imunohistoquímica ou imunofluorescência (ADDIE, 2012).

A PIF é classificada em duas formas clínicas: uma efusiva (úmida); caracterizada por vasculite e poliserosite – que ocasiona efusões pericárdica, torácica e/ou abdominal, e uma forma não-efusiva (seca); caracterizada por lesões piogranulomatosas em órgãos (KIPAR et al., 2005; ADDIE, 2012).

Os sinais clínicos da PIF são altamente variáveis e estão associados com a distribuição da vasculite e das lesões piogranulomatosas (ADDIE et al., 2009). Os felinos com a forma efusiva da PIF apresentam manifestações clínicas não específicas, sendo as mais comuns: febre refratária aos antibióticos, letargia, anorexia e perda de peso, porém ocasionalmente permanecem alerta, se

alimentando e mantêm a condição corporal. Ascite é a manifestação mais óbvia da forma efusiva. Efusões torácica e pericárdica também podem ocorrer. Em alguns gatos, dispneia e taquipneia ocorrem devido à efusão restrita ao tórax. Alguns animais também podem apresentar icterícia. Massas abdominais podem ser palpadas, refletindo aderências de omento e vísceras e/ou aumento dos linfonodos mesentéricos (ADDIE et al., 2009).

Os felinos com a forma seca da PIF podem apresentar sinais mais específicos dependendo do órgão acometido pela vasculite ou lesão piogranulomatosa. Esta forma é muito mais difícil de diagnosticar. Febre, anorexia, perda de peso e letargia podem ser os únicos sinais, particularmente nos estágios iniciais da doença (ADDIE et al., 2009). Quase todos os gatos com PIF não-efusiva apresentam envolvimento ocular com uveíte, levando às alterações na coloração da íris, discoria ou anisocoria secundária a irite (NORRIS et al., 2005), perda súbita da visão, hifema, precipitados ceráticos. Sinais neurológicos refletem um envolvimento focal, multifocal ou difuso do cérebro, cordão medular e meninges (FOLEY; RAND; LEUTENEGGER, 2003). Em alguns casos, pode ocorrer pneumonia piogranulomatosa difusa que acarreta no desenvolvimento de dispneia (TRULOVE et al., 1992). À palpação abdominal, pode-se notar aumentos dos linfonodos mesentéricos, irregularidades na superfície dos rins e em outros órgãos (PEDERSEN, 2009; ADDIE, 2012).

Os gatos que apresentam PIF clinicamente evidente provavelmente não sobreviverão por mais de 12 meses, pois não há tratamento efetivo (PEDERSEN, 1995a) e o curso da doença resulta em óbito do animal (HARTMANN et al., 2003).

As dificuldades em diagnosticar de forma definitiva a PIF são decorrentes dos sinais clínicos não específicos, da ausência de alterações patognomônicas nos exames de patologia clínica e de imagem (PALTRINIERI et al., 2001), além da baixa sensibilidade e especificidade dos testes utilizados rotineiramente (HARTMANN et al., 2003). Atualmente, não há um método de diagnóstico laboratorial não invasivo para identificar felinos com PIF (ADDIE et al., 2009), sendo a imunohistoquímica o padrão ouro para o diagnóstico da PIF.

A mensuração dos títulos séricos de anticorpos anti-FCoV é extensivamente utilizada como ferramenta diagnóstica, porém é incapaz de determinar com qual patotipo o animal teve contato (ADDIE, 2012). Muitos gatos saudáveis apresentam títulos de anticorpos altos e crescentes, porém esses gatos podem nunca

desenvolver a PIF (SPARKES; GRUFFYDD-JONES; HARBOUR, 1991; ADDIE; JARRETT, 1992a; SPARKES et al., 1992). Por outro lado, aproximadamente 10% dos felinos com PIF não apresentam anticorpos (HARTMANN et al., 2003). Nesses casos, os anticorpos provavelmente estão ligados em complexos antígeno-anticorpos e, portanto, não são detectados. Adicionalmente, felinos com PIF em estágio terminal apresentam títulos decrescentes de anticorpos (PEDERSEN, 1995b). Nenhum laboratório no Brasil realiza a titulação de anti-FCoV, como o teste só é realizado no exterior, os resultados demoram 30 dias, além de possuírem um custo elevado.

As técnicas de biologia molecular que detectam o genoma viral não são capazes de distinguir os patotipos uma vez que não há um marcador gênico específico para cada patotipo. Contudo, a detecção do RNA mensageiro (RNAm) por RT-PCR em monócitos circulantes evidencia que o vírus está se replicando nessas células e infectando os felinos sistemicamente (SIMONS et al., 2005). No estudo que foi descrito pela primeira vez, 46% (301/651) dos casos com suspeita clínica de PIF e 93% (75/81) dos animais positivos para PIF na avaliação histopatológica foram RNAm positivos. Apesar de ser um teste promissor, o RNAm dos FCoV foi detectado em 5% (23/424) dos gatos clinicamente saudáveis.

Levando-se em consideração a elevada prevalência de FCoVs em gatis, a complexidade da patogenia da PIF e sua gravidade, há uma grande necessidade do desenvolvimento de um marcador diagnóstico para a PIF, pois atualmente é necessária uma série de testes que dependem altos custos e apresentam muitas limitações. Desta maneira, os dados gerados sobre a diversidade molecular aqui estudada contribuirão para um entendimento mais aprofundado dos coronavírus que acometem os felinos.

## 2 OBJETIVOS

1. Estudar vias de eliminação dos patótipos FIPV e FECoV de coronavírus felino.
2. Avaliar a plausibilidade das hipóteses opostas de mutação *in vivo* e da circulação de linhagens de FCoV de alta e baixa virulência.
3. Determinar a diversidade gênica entre populações de FCoV e sua relação com patótipo de alta virulência.
4. Pesquisar marcadores moleculares para a diferenciação entre os patótipos FIPV e FECoV de coronavírus entre os genes 3a-c, E e M.

## Capítulo I. Intrahost diversity of feline coronavirus: a consensus between the circulating virulent/avirulent strains and the internal mutation hypotheses?

### 3 INTRODUCTION

Feline coronavirus (FCoV), a widespread pathogen of domestic cat populations worldwide, is an enveloped single-stranded RNA virus of the order *Nidovirales*, family *Coronaviridae*, subfamily *Coronavirinae*, genus *Alphacoronavirus*, species *Alphacoronavirus1*. Most infections are either asymptomatic or result in a mild, self-limiting gastrointestinal disease, and, in these cases, the causative agent is the feline enteric coronavirus (FECoV) pathotype. In contrast, feline infectious peritonitis (FIP), a possible complication of FCoV infection in a small proportion of cats, is a lethal, systemic immune-mediated disease caused by a second FCoV pathotype, feline infectious peritonitis virus (FIPV) (POLAND et al., 1996; VENNEMA et al., 1998).

FIP is characterised by fibrinous/granulomatous serositis, with protein-rich effusions in the body cavities of affected cats, as well as granulomatous-necrotising lesions, periphlebitis and granulomatous inflammatory lesions in several organs, particularly in the liver, kidney, spleen, leptomeninges, and eyes (KIPAR et al., 2005). The pathogenesis of FIP is not fully understood, but it has been shown that monocyte-triggered vasculitis, in association with systemic monocyte and endothelial cell activation, is an essential event (KIPAR et al., 2005), most likely in combination with antibody-mediated enhancement and complement activation (DEWERCHIN; CORNELISSEN; NAUWYNCK, 2005). Specific genetic determinants of these clinical outcomes have yet to be discovered in cats. This disease is one of the most serious viral infections in cats, not only because of its fatal nature but also because of the difficulties in diagnosing FIP antemortem and in controlling the spread of FCoV (BROWN et al., 2009).

The key to a deeper understanding of FCoV diseases in cats is the exact nature of the relationship between the two FCoV pathotypes; two important hypotheses have been suggested. The hypothesis known as the “internal mutation

theory” is widely accepted (POLAND et al., 1996; HERREWEGH et al., 1997; VENNEMA et al., 1998; PEDERSEN et al., 2009; CHANG et al., 2010; CHANG; EGBERINK; ROTTIER, 2011), and it states that FIP occurs when a cat is exposed to variants of FCoV that have mutated within the host and are able to disseminate from the gut (the primary site of infection) by gaining the ability to efficiently replicate within the macrophages (POLAND et al., 1996; VENNEMA et al., 1998). However, any stable genetic differences between FECoV and FIPV that can account for their differing pathogenicities remain to be identified (DYE; SIDDELL, 2007).

The alternate “circulating high virulent-low virulent” FCoV hypothesis of viral pathogenesis suggests that both distinctive pathogenic and benign lineages of FECoV might be present in a cat population and that the disease will develop only in those cats infected by the virulent strains already available from other infected cats (BROWN et al., 2009). The existence of distinct “high virulent-low virulent FCoVs” is an alternate, and less popular, hypothesis for FIP pathogenesis (DYE; SIDDELL, 2007; BROWN et al., 2009). As FIP occurs sporadically and outbreaks of FIP in domestic cat populations are rather uncommon, there has been little epidemiologic support for this hypothesis (POLAND et al., 1996).

Most authors have concurred that although a low-level monocyte-associated viraemia is found with FECoV infections, this virus is mainly confined to the gut (DYE; SIDDELL, 2007; KIPAR et al., 2010). This is in contrast to the highly virulent FIPV, which disseminates systemically with high viral titres. Thus, obtaining sequence data from enteric and non-enteric FCoVs found within individual cats with FIP may shed more light on any genetic differences between FECoV and FIPV (DYE; SIDDELL, 2007).

To evaluate the most controversial issue concerning current FCoV virology, the coexisting hypotheses of the intra-host and inter-host origins of FIPV in regard to FIP pathogenesis and to gain more insight into FCoV evolution, this study aimed to assess the molecular diversity of FCoVs in multiple organs of cats with signs of FIP and in faecal samples from cats without signs of FIP.

## **4 MATERIALS AND METHODS**

### **4.1 Animals and sample collection**

During 2010-2012, tissue samples (eye, cerebrum, cerebellum, lung, heart muscle, thoracic lymph node, thymus, liver, spleen, stomach, mesenteric lymph node, peripancreatic lymph node, kidneys, large and small intestines, and urinary bladder), abdominal, thoracic, and pericardial effusions, aqueous humour, and faecal samples were collected at necropsies from 10 deceased or euthanised unrelated cats with suspected FIP, for a total of 190 samples. Sterile instruments and disposable materials were used for sample collection.

Additionally, faecal samples from five cats without clinical signs of FIP were also collected; none of these had cats developed FIP as of the time of writing this study. These cats came from 3 multiple-cat households, one of them with an outbreak of diarrhoea at the time that the 3 samples from the different cats were collected. All samples were flash-frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  until the RNA extraction.

### **4.2 Total RNA extraction**

Organ samples were prepared as 30% (v/v) suspensions in UltraPure™ diethyl pyrocarbonate (DEPC)-treated water (Invitrogen, Carlsbad, USA) and submitted to 3 freeze-thaw cycles in liquid nitrogen at  $56\text{ }^{\circ}\text{C}$  and clarified at  $5,000 \times g$  for 15 min at  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Effusion and aqueous humour were concentrated at  $12,000 \times g$  for 15 min at  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Faecal samples were prepared as 30% (v/v) suspensions in UltraPure™ diethyl pyrocarbonate (DEPC)-treated water (Invitrogen, Carlsbad, USA) and clarified at  $12,000 \times g$  for 15 min at  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . The total RNA was extracted from the supernatants of organs and faecal suspensions and pellets from effusions with TRIzol™ reagent (Invitrogen, Carlsbad, USA), according to the manufacturer's instructions. The RNA was eluted in 30  $\mu\text{l}$  of UltraPure™ DEPC-treated water.



### 4.3 RT-PCR for the detection of the FCoV mRNA of the membrane (M) gene

All samples were screened for the presence of FCoV M gene mRNA using primers previously described (SIMONS et al., 2005), with modifications (2RNAmA TAATRMCATARACGADCCAGCT, nt 26440-26461 and 2RNAmS GTGCTAGVTTTGTCTTCGGACAMC nt 60-83, positions regarding strain FIPV 79-1179).

A positive RNA control was prepared from the abdominal effusion of a cat with FIP by an in vitro transcription with a MEGAscript™ T7 kit (Ambion, Austin, USA) according to the manufacturers' instructions, using the above mentioned primers. UltraPure™ DEPC-treated Water (Invitrogen, Carlsbad, USA) was used as a negative control.

For the 190 samples, the cDNA was synthesised in 10 µL reactions using 3.5 µL of the RNA solution and 1 µM 2RNAmS of the reverse primer and M-MLV Reverse Transcriptase® (Invitrogen, Carlsbad, USA), as per the manufacturer's instructions.

The subgenomic mRNA of the M gene was then amplified using 0.5 µM of each primer and GoTaq™ Green Master Mix 1X (Promega Corporation, Madison, USA) according to the manufacturer's protocols. The primer annealing temperature was 50 °C. The PCR products (295 bp) were visualised by electrophoresis on 1.5% agarose gels stained with SYBR™ Green I nucleic acid gel stain (Invitrogen, Carlsbad, USA).

### 4.4 Partial M gene amplification and sequencing

cDNA was synthesised using Random Primers (Invitrogen, Carlsbad, USA) and M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, USA), according to the manufacturer's protocols. The partial M gene (575 bp) was then amplified using 0.5 µM of both reverse (26925-26944 nt positions regarding strain FCoV UU47) and forward primers (26968-26292 nt positions regarding strain FCoV UU47) (BROWN et

al., 2009) and GoTaq™ Green Master Mix 1X (Promega Corporation, Madison, USA) as per the manufacturer's instructions.

Amplicons were purified from agarose gels with Illustra™ (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) and submitted to bidirectional DNA sequencing with BigDye 3.1™ (Applied Biosystems, Carlsbad, USA), according to the manufacturer's protocols. Products were resolved using a 3500™ Genetic Analyser (Applied Biosystems, Foster City, USA), and the chromatograms were analysed with Phred at <http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>. Positions with a quality score >20 were used to generate contiguous sequences with Cap-Contig implemented in the software Bioedit 7.0.9.0 (HALL, 1999). Those sequences were then submitted to BLAST/n at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST> to confirm the amplicon identities.

The M gene partial sequences and the putative amino acid sequences from each sample were aligned with homologous sequences from both FCoV pathotypes retrieved from GenBank (Figure 1) with CLUSTAL/W in Bioedit 7.0.9.0 (HALL, 1999), and a phylogenetic tree for the nucleotide sequences was generated with the neighbour-joining distance algorithm and the maximum composite likelihood model with 1,000 bootstrap replicates using MEGA 5.0 (TAMURA et al., 2011). Amino acid alignment was used to search for previously reported pathotype-specific markers (BROWN et al., 2009).

#### **4.5 Histopathologic analysis**

Organ samples were also fixed in 10% buffered formalin and routinely embedded in paraffin. Sections (5 µm) were stained with hematoxylin and eosin (HE). The HE-stained slides of the organ sections were evaluated for evidence of granulomatous and pyogranulomatous lesions.

## 5 RESULTS

### 5.1 RT-PCR for the detection of FCoV mRNA of the membrane gene

In all 10 cats with FIP, FCoV mRNA was detected in at least one of the samples. Of the 190 individual samples, 77 (40.53%) were positive for the M gene. The abdominal effusions (5/6), mesenteric lymph nodes (7/10), large intestines (7/10), lungs (6/10), thoracic effusions (4/8), kidneys (10/20) and aqueous humours (8/20) were the most frequent FCoV replication sites. Of the 5 faecal samples from cats without FIP, 3 were positive for FCoV M gene mRNA.

### 5.2 Partial M gene amplification, sequencing and phylogenic analysis

Of the euthanised or diseased cats, 25.26% samples (48/190) were positive for the FCoV M gene. Multiple samples from each cat were determined to be positive, by RT-PCR, for the FCoV M gene. Of these, the most frequently positive samples were the contents of the large intestine (5/11), spleen (4/10) and lungs (4/10). All faecal samples from the 5 cats without FIP were positive for the FCoV M gene.

The sequences obtained in this study were submitted to the GenBank database under the accession numbers JQ627051-JQ627090.

When compared by phylogenic analysis, the nucleotide sequences of the M gene (positions 26293 to 26907 regarding strain FCoV UU47) from the cats with FIP and the cats with FECoV in this study were distributed in paraphyletic groups (Figure 2). Sequence strains from 3 cats with diarrhoea but without PIF (Cats 1-3) from a multiple cat household were grouped in the same cluster. The sample-specific FCoV strain's differentiation and nucleotide polymorphism among sequences from the same cat was low ( $\geq 98\%$ ), whereas the overall sequence identification for the M gene was  $\geq 91\%$  among all FIPV sequences (Table 1). Mutations consisted of minor SNP changes that appeared to be randomly scattered among the sequences; few mutations resulted in amino acid changes. No geographic pattern was observed. Of

the cats without FIP that harboured FECoV, the amino acid sequence identities for the M gene were 100% among cats (Cats 1-3) from the same cattery, and the overall sequence identity for the M gene was  $\geq 91\%$ .

Table 1 - Feline coronavirus membrane (M) gene sequence identities (positions 26293 to 26907 regarding strain FCoV UU47) from different samples of a same cat with FIP

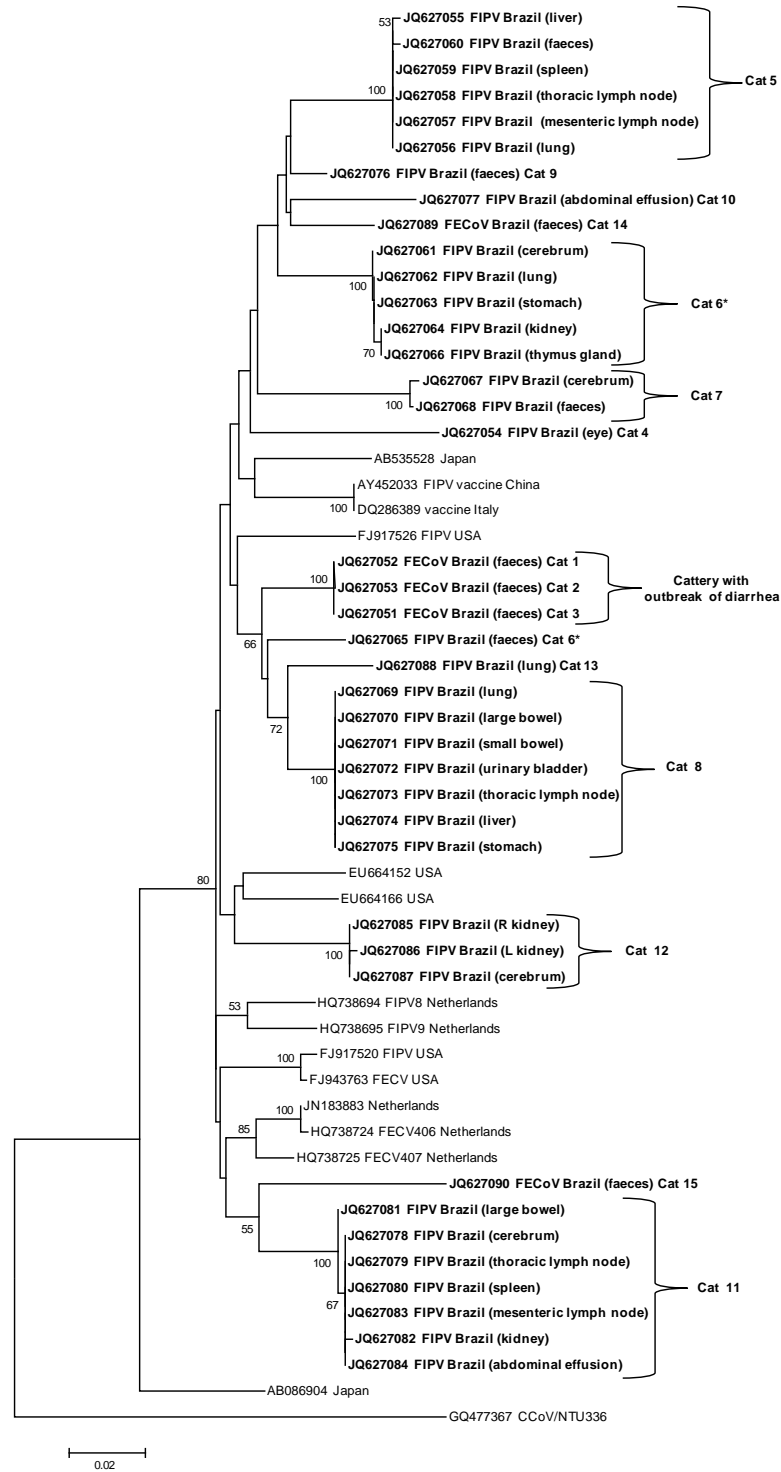
<b>Cat</b>	<b>% sequence identity<sup>a</sup></b>	<b>SD</b>	<b># sequences</b>	<b>GenBank accession #</b>
<b>Cat5</b>	99.9	0.001	n=6	JQ627055 - 60
<b>Cat6</b>	98.0	0.028	n=6	JQ627061 - 66
<b>Cat7</b>	99.6	0.000	n=2	JQ627067 - 68
<b>Cat8</b>	100.0	0.000	n=7	JQ627069 - 75
<b>Cat11</b>	99.9	0.001	n=7	JQ627078 - 84
<b>Cat12</b>	99.9	0.001	n=3	JQ627085 - 87

Source: Hora, A.S. (2013).

Note: <sup>a</sup>The percentage of the sequence identity was determined by comparison with the consensus sequences of the FCoV obtained from different samples of the same cat. SD, standard deviation.

Nonetheless, a striking exception was cat 6, in which two different lineages of FCoV, one enteric and one systemic, were found that segregated apart in the M gene tree (Figure 2), with a nucleotide identity of 94% among the enteric sequence and the systemic (n=5) sequence

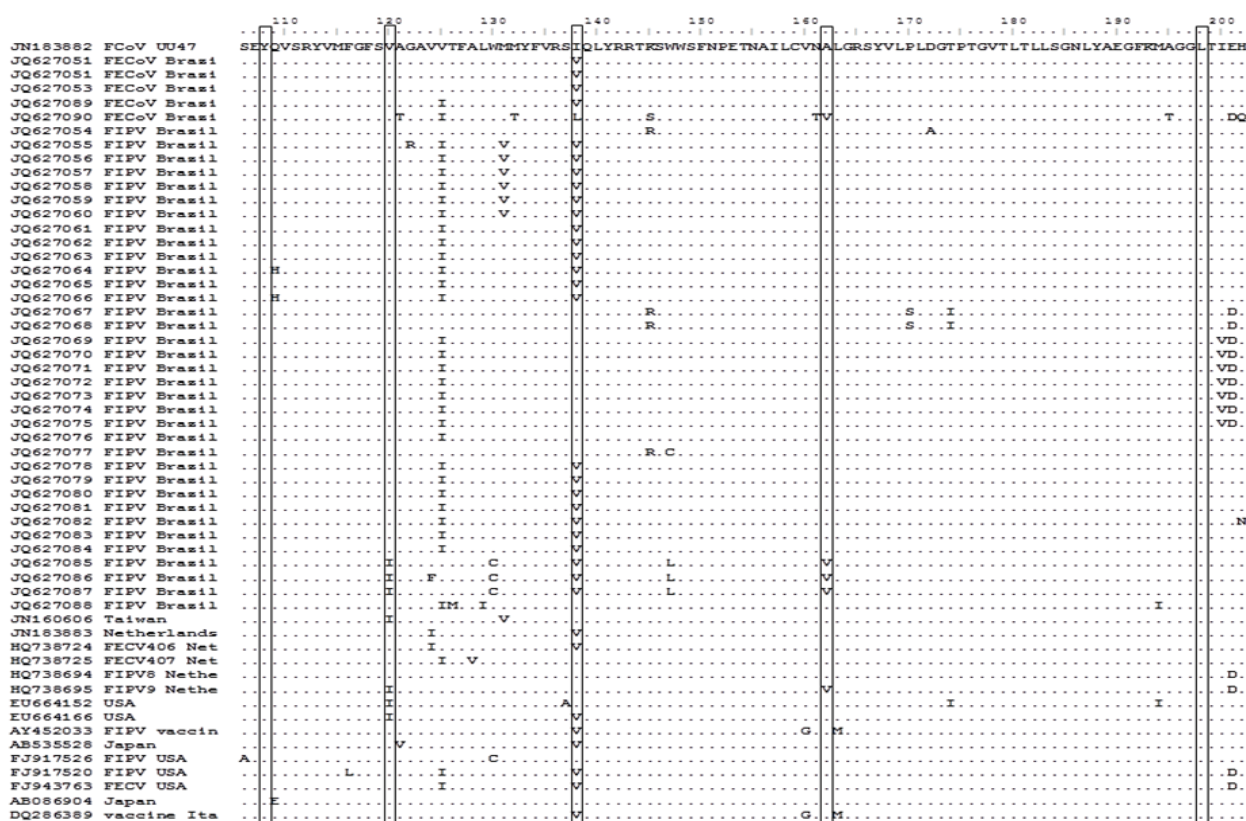
Figure 2 - Neighbour-Joining MCL phylogenetic tree of the M gene partial sequences of FCoV (positions 26293 to 26907 regarding strain FCoV UU47). The tree was constructed using a canine coronavirus sequence as an outgroup (GQ477367). Numbers on the nodes indicate the bootstrap support from 1,000 replications. Only bootstrap values >50 are shown. The scale bar represents the number of substitutions per nucleotide. The numbers 1 to 15 identify each cat



Source: Hora, A.S. (2013).

Five amino acid sites in the M protein suggested as potential FIPV signatures (BROWN et al., 2009) were evaluated based on the reference sequence for FCoV (GenBank JN183882). Within the lineages obtained in the present study, no amino acid polymorphism was observed at position 108 or 198 (Figure 3). The amino acids at positions 120, 138 and 162 occurred with no specific pattern in the FIPV and FECoV sequences: Val120 in 100% (5/5) of FECoV and in 91.4% (32/35) of FIPV; Ile120 in 8.6% (3/35) of FIPV; Ile138 in 34.3% (12/35) of FIPV; Val138 in 80% (4/5) of FECoV and 65.7% (23/35) of FIPV; Leu138 in 20% (1/5) of FECoV; Ala162 80% (4/5) of FECoV and in 91.4% (32/35) of FIPV; Val162 in 20% (1/5) of FECoV and 8.6% (3/35) of FIPV.

Figure 3 - Alignment of the amino acid sequences of partial M proteins of the FCoVs compared with the feline coronavirus reference sequence (GenBank accession no. JN183882) and other FCoV sequences from GenBank. The 5 aa residues at positions 108, 120, 138, 162, and 198, suggested as potential diagnostic sites (BROWN et al., 2009) are boxed



Source: Hora, A.S. (2013).

### **5.3 Histopathologic analysis**

A histopathological analysis was performed for 8 of the 10 necropsied cats. HE-stained sections typically showed localised inflammation with macrophages, neutrophils, lymphocytes, and plasma cells. Vascular lesions were found surrounded by a proliferation of inflammatory cells. Focal accumulations of inflammatory cells and necrotic-proliferative lesions were observed in granulomatous lesions. Table 2 shows the main histopathological features and the FCoV replication sites for each cat.

Table 2 - Histopathological analysis and results of FCoV mRNA RT-PCR in diseased cats with FIP

Cat (n=8)	Histopathological findings	Positive samples for mRNA FCoV
<b>Cat6</b>	Pyogranulomas in lung, kidneys, cerebrum, and cerebellum Mild to moderate, subacute, multifocal fibrinous pleuritis Vasculitis in heart, lung, omentum, kidneys, cerebrum, and cerebellum	cerebrum, cerebellum, lung, thymus, spleen, stomach, mesenteric lymph node, kidneys, aqueous humour, faeces
<b>Cat7</b>	Pyogranulomas in liver, kidneys, cerebrum, and cerebellum Vasculitis in cerebrum	cerebellum, large intestine, large intestine content
<b>Cat8</b>	Severe, subacute, diffuse fibrinous pleuritis and peritonitis	lung, thoracic lymph node, thymus, liver, spleen, stomach, mesenteric lymph node, peripancreatic lymph node, kidneys, large and small intestines, small intestine content, urinary bladder, abdominal effusion
<b>Cat9</b>	Diffuse, severe, non-suppurative meningoencephalitis	aqueous humour right eye, large intestine, large intestine content
<b>Cat10</b>	Moderate, subacute, diffuse fibrinous pleuritis	mesenteric lymph node, large and small intestines contents, abdominal effusion
<b>Cat11</b>	Subacute, multifocal fibrinous peritonitis Moderate, diffuse interstitial pneumonia Pyogranulomas in kidneys (with bacteria) and liver	cerebrum, aqueous humour left eye, mesenteric lymph node, large intestine
<b>Cat12</b>	Subacute, focally extensive fibrinous pleuritis Pyogranulomas in kidneys	cerebrum, cerebellum, aqueous humour left eye, thoracic effusion
<b>Cat13</b>	Moderate, multifocal granulomatous pleuritis Severe, granulomatous, interstitial nephritis, associated with coalescing areas of necrosis	cerebrum, aqueous humour left eye, lung, thoracic effusion, mesenteric lymph node, large and small intestines contents, kidneys, abdominal effusion

Source: Hora, A.S. (2013).



## 6 DISCUSSION AND CONCLUSIONS

In this investigation, both double and single FCoV pathotype infections have been found in cats with feline infectious peritonitis, which supports both hypotheses of a viral pathogenesis of the disease based on the M gene phylogeny from FCoV strains detected in naturally infected cats.

A phylogenetic analysis showed that nucleotide sequences of the FIPV and FECoV M genes do not segregate in a biotypical pattern, a distribution consistent with the *in vivo* mutation transition hypothesis, which postulates that a *de novo* virus mutation occurs *in vivo*, giving rise to highly virulent strains without the need for exogenous highly virulent strains. A similar pattern was observed in a previous study that also examined the M gene (CHANG; EGBERINK; ROTTIER, 2011) which determined that FIPVs originate from FECVs by the accumulation and selection of point mutations (POLAND et al., 1996; VENNEMA et al., 1998; PEDERSEN et al., 2009). The internal mutation hypothesis has been widely accepted and is mainly supported by the close similarities between FECoV and FIPV and the low incidence of FIP outbreaks, despite the high proportion of FCoV-seropositive cats (SPARKES; GRUFFYDD-JONES; HARBOUR, 1992; HERREWEGH et al., 1997; HOLST et al., 2006; PRATELLI, 2008).

Although no disease-specific clusters of FCoVs were found, samples from Cat 6 were particularly informative, as two different strains of FCoV, one enteric and one systemic, can be clearly observed in Figure 1, which, in contrast to the other sampled individuals, is in agreement with the two different pathotypes hypothesis. The source for different FCoVs lineages in a cat may be a superinfection (BROWN et al., 2009), but in an experimental study in which cats were infected with two variants of FIPV, a variant prevailed in each cat (PEDERSEN et al., 2009). Cat 6 might thus have acquired at least two lineages, one with tropism for the intestinal epithelium and the other with a macrophage tropism and a systemic spread that led to the development of the disease.

The full length genomic sequence of the viruses found in two different tissues of a cat with classical FIP, one enteric (jejunum) and one non-enteric (liver), revealed a 100% nucleotide identity (DYE; SIDDELL, 2007), a finding that questions the well

accepted 'internal mutation theory' of FIPV pathogenicity. Nonetheless, it must be taken into account that consensus sequencing, without prior cloning, can mask minority virus populations, and further viral lineages could be present at lower levels within an animal. The M gene mRNA that was detected in the faeces from Cat 6 is a further indication that this cat had two active infections, one systemic and the other enteric.

The current belief is that cats with FIPV do not transmit this pathotype to other cats (VENNEMA et al., 1998), but it is theoretically possible for cats with an infection in the intestinal wall or kidneys to shed FIPV in the faeces or urine, respectively. The identity among the sequences obtained from the stool or intestines with the sequences of other tissues in cats with FIP in this study was  $\geq 99.9\%$ , indicating that the FIPV pathotype can indeed be spread via faeces and that a cat with FIP can excrete FCoV strains with no distinction between FECoV and FIPV. Accordingly, mutations in the 3c gene identical to the FIPVs from tissues were present in the faeces of some cats, thus making horizontal transmission theoretically possible in certain circumstances (PEDERSEN et al., 2009; PEDERSEN et al., 2012) and supporting the two-pathotype hypothesis.

A sample of the urinary bladder from a cat (Cat 8) was positive for M gene mRNA; this finding shows that the urinary shedding of FCoV is also plausible. In cats, the infectivity of urine for FCoV has previously been reported (HARDY; HURVITZ, 1971). Likewise, human patients with severe acute respiratory syndrome (SARS) caused by the HCoV-SARS coronavirus have been reported to shed the virus via urine and faeces (YAM et al., 2003; CHAN et al., 2004). Furthermore, avian coronavirus also displays faecal excretion and replication in the kidneys of domestic fowl (CAVANAGH, 2007). These reports not only show that FCoV might be shed via the urinary tract but also that this is a conserved feature for coronaviruses.

The phylogenetic analysis has shown that the nucleotide sequences of FCoV generally clustered according to the cattery, irrespective of their pathotypes (CHANG et al., 2010). In some circumstances, multiple FCOVs lineages can be observed in the same cattery, due to the elevated admission of new individuals in cases of open catteries or shelters (CHANG; EGBERINK; ROTTIER, 2011). A unique genetic fingerprint was observed in sequences obtained from cats (Cats 1-3) of the same cattery that underwent an outbreak of diarrhoea, indicating that coronavirus infection

most likely originated from a single founder virus within this closed group of cats. Catteries and closed multi-cat environments usually have one major enzootic strain of coronavirus that persists over long periods of time, and these major enzootic strains are dominant even with exposure to other strains (POLAND et al., 1996; HERREWEGH et al., 1997; VENNEMA et al., 1998; ADDIE et al., 2003; PEDERSEN et al., 2009).

A phylogeographic pattern was not observed among the FCoV strains studied herein compared with sequences from other countries, but a pronounced mutational drift (7-10%) was found in strains from the same geographic region, quite similar to the 6-16% reported for cats from distant areas of the western USA (PEDERSEN et al., 2009). As this is the first report on FCoV diversity in Brazilian cats, further comparisons with other geographic areas within the country are an issue for future research. Recombination and a high mutation rate are common phenomena among coronaviruses, which provide a mechanism for the rapid emergence of new viral strains with dramatically altered tropisms and pathogenicity, which can have a significant impact on the host disease (HERREWEGH et al., 1997; VENNEMA et al., 1998; BROWN et al., 2009; PEDERSEN et al., 2009; CHANG et al., 2010).

FCoV strains from FIP-positive cats, as determined by a classical pathological or immunohistochemistry diagnosis, have been reported as displaying YIVAL/YIIAL in the M protein (positions 108, 120, 138, 162, and 198) (BROWN et al., 2009), but such markers were absent in all FECoV and FIPV putative M sequences recovered in the present investigation, as previously described (CHANG; EGBERINK; ROTTIER, 2011; PEDERSEN et al., 2012), which strongly argues against the currently accepted criteria for FIPV/FECoV differentiation.

As both hypotheses have been found as plausible according to these results, this could mean that FIPV can both emerge endogenously and be transmitted to different cats as a “ready” virulent pathotype, which has major implications for the understanding of the dynamics of viral transmission.

## Capítulo II - Proteína 3c do coronavírus felino: um candidato a marcador de virulência?

### 7 INTRODUÇÃO

O coronavírus felino (FCoV) é um patógeno importante e amplamente disseminado na população de gatos domésticos. Apresenta dois patótipos, o coronavírus entérico felino (FECoV) e o vírus da peritonite infecciosa felina (FIPV); ambos patótipos podem ser classificados também nos sorotipos I e II (PEDERSEN, 2009). A principal diferença entre os patótipos é que o FIPV é capaz de infectar monócitos e macrófagos causando uma infecção sistêmica e doença fatal, enquanto o FECoV se restringe à replicação no epitélio intestinal maduro causando infecção assintomática na maioria das vezes. Porém alguns autores consideram este tropismo relativo, pois o FECoV pode ter uma breve fase sistêmica de replicação, que também envolve macrófagos e monócitos (KIPAR et al., 2010; VOGEL et al., 2010).

Os maiores genomas de vírus RNA conhecidos até o presente são dos coronavírus; os FCoVs possuem genoma de aproximadamente 29kb, são vírus RNA de fita simples, polaridade positiva, envelopados e com um alto grau de variabilidade gênica (ADDIE, 2012). Devido à baixa eficiência e na maioria dos casos ausência de atividade revisora da RNA polimerase RNA dependente, os vírus RNA apresentam uma alta taxa de erro durante a sua replicação, gerando muitas mutações em cada ciclo de replicação (DOMINGO; SHELDON; PERALES, 2012), o que pode ser intensificado pelo tamanho do genoma dos coronavírus.

Quasiespécies virais são uma distribuição dinâmica de sequências nucleotídicas relacionadas, porém não idênticas, resultando em um espectro de genomas virais mutantes e recombinante, os quais possuem complexidade e composição altamente relevantes, em constante processo de variação gênica, competição e seleção. Os principais eventos na biologia dos vírus RNA, como a capacidade de alterar o tropismo celular ou de escape do sistema imune mais efetivo, têm origem no repertório de variantes presentes (DOMINGO; SHELDON; PERALES, 2012). A influência das quasiespécies na patogenia de diversas doenças

virais foi descrita em diversos patógenos virais, como para o vírus da imunodeficiência humana (PENTON; BLACKARD, 2013; QUAN; XU; WAINBERG, 2014), vírus da peste suína clássica (TOPFER et al., 2013), poliovírus (VIGNUZZI et al., 2006), influenza (MOK et al., 2013), dentre outros.

Atualmente, nenhum marcador gênico conhecido é capaz de diferenciar os patótipos FECoV de FIPV (DYE; SIDDELL, 2007; BROWN et al., 2009). Determinantes gênicos virais dos FCoV foram sugeridos nos genes S (ROTTIER et al., 2005; REGAN et al., 2008; CHANG et al., 2012; LICITRA et al., 2013), 3a-c (VENNEMA et al., 1998; PEDERSEN et al., 2009; CHANG et al., 2010; PEDERSEN et al., 2012; HSIEH et al., 2013), 7a-b (VENNEMA et al., 1998; KENNEDY et al., 2001; DEDEURWAERDER et al., 2014) e M (BROWN, 2011) e correlacionados com a manifestação da PIF. O gene 3c é o mais estudado, estando presente na forma truncada em quase todas as amostras provenientes de animais com PIF. Entretanto, os estudos prévios dos genes 3a-c utilizaram o sequenciamento direto como forma de avaliar a composição gênica dos FCoV nas amostras, obtendo-se assim apenas uma sequência e não o espectro mutante presente. Assim sendo, informações obtidas de uma sequência podem não ser adequadas para a detecção de mutações (LICITRA et al., 2013).

Dessa maneira, na presente investigação, com a finalidade de avaliar a diversidade gênica entre as quasiespécies virais intra e inter-hospedeiros por meio da clonagem e sequenciamento dos genes 3a-c, E e M do coronavírus felino, foram obtidas amostras teciduais e/ou fecais de gatos com PIF e amostras fecais de gatos sem PIF.

## 8 MATERIAL E MÉTODOS

### 8.1 Animais e coleta de amostras

Durante o período de 2010 a 2013, foram coletadas amostras de tecidos, líquidos cavitários e fezes durante a necropsia de 18 gatos com manifestações clínicas e alterações macroscópicas e microscópicas compatíveis com PIF (dados não apresentados); dentre esses, apenas seis animais apresentaram manifestações de PIF na forma seca (alterações neurológicas), sendo que o restante apresentou acúmulo de efusão em cavidades corpóreas – característico de PIF efusiva.

Todos os gatos com PIF foram provenientes de regiões geográficas distintas, com exceção de dois animais (Arthur e Rebeca) que habitavam o mesmo domicílio, sendo que o gato Arthur foi eutanasiado um mês antes de a gata Rebeca vir a óbito.

Foram inclusas nesse estudo amostras de fezes de cinco gatos sem manifestações clínicas de PIF, dos quais três gatos pertenciam ao mesmo domicílio, onde todos os animais apresentavam quadro agudo de diarreia. Um dos felinos veio à óbito em decorrência de complicações respiratórias devido ao complexo respiratório viral felino, desse gato foram também obtidas amostras teciduais durante a necropsia.

Amostras provenientes de animais utilizados no presente capítulo também o foram no capítulo I. A resenha dos animais encontra-se no apêndice A.

Para uma identificação mais fácil das amostras, foi atribuída a seguinte nomenclatura: Nome do gato/origem da amostra/presença (+) ou não (-) de PIF/origem do gato/número do clone. Todos os gatos desse estudo foram provenientes do estado de São Paulo, como o estudo não objetivou uma análise geográfica, cada domicílio recebeu um número com a finalidade de identificar somente aqueles animais que foram contactantes.

Todas as amostras coletadas foram submetidas à detecção do RNA mensageiro (RNAm) dos FCoV para confirmar a infecção. Uma amostra de tecidual de cada gato com PIF e uma amostra de fezes de cada gato com PIF e sem PIF foram selecionadas para a amplificação dos genes 3a-c, E e M dos FCOVs.

Todas as amostras foram coletadas com material estéril e armazenadas em microtubos livres de RNAses, DNAses e pirogênios ou coletores universais estéreis. Em seguida, foram mantidas em banho de gelo durante a coleta e transporte, em seguida foram congeladas em nitrogênio líquido (-196°C) e transferidas para um freezer -80°C, onde permaneceram até o momento do processamento laboratorial.

## 8.2 Extração de RNA

As amostras de órgãos foram maceradas e suspensas em uma concentração de 30% (v/v) com água ultrapura tratada com dietil pirocarbonato (DEPC) e em seguida foram submetidas a três ciclos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento a 56°C, e clarificadas a 5.000xg, por 15 minutos a 4°C. As amostras fecais foram preparadas da mesma forma que as amostras teciduais, com exceção dos ciclos de congelamento e descongelamento, que não foram realizados. A extração de RNA total foi realizada com TRIzol<sup>®</sup> Reagent (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, EUA), seguindo-se as instruções do fabricante, a partir do sobrenadante obtido.

## 8.3 Detecção do RNA mensageiro do gene M dos FCoV

Na reação em cadeia pela polimerase (PCR), precedida pela reação de transcrição reversa (RT) para a detecção do RNAm dos FCoVs foi utilizado como controle positivo, um RNA transcrito *in vitro* preparado a partir de amostras de efusão abdominal de um gato com PIF utilizando-se um kit comercial (MEGAscript<sup>™</sup> T7 kit, Ambion, Austin, USA), segundo recomendações do fabricante. Como controle negativo, foi utilizada água ultrapura tratada com DEPC (UltraPure<sup>™</sup> DEPC-treated Water, Invitrogen, Carlsbad, USA).

Para a obtenção do DNA complementar (cDNA), por amostra, foram desnaturados 3,5µL de RNA total extraído a 95°C, durante 5 minutos, os quais a

seguir foram imersos em banho de gelo. A RT foi realizada com 1x First Strand Buffer<sup>®</sup> (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, EUA), 1mM dTNPs, 10mM DTT, 1 $\mu$ M primer antisenso (Quadro 1), 100U de M-MLV Reverse Transcriptase<sup>®</sup> (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, EUA) e água ultrapura tratada com DEPC q.s.p. para uma reação final de 10 $\mu$ L. A RT foi realizada em um termociclador GeneAmp<sup>®</sup> PCR System 9.700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) a 37°C, durante 60 minutos.

Para a reação de PCR, por amostra, foram utilizados 12,5  $\mu$ L do kit comercial GoTaq<sup>®</sup> Green Master Mix (Promega, Madison, WI, EUA), 0,5  $\mu$ M de cada *primer* (Quadro 1), 2,5  $\mu$ L de cDNA e água DEPC q.s.p. para uma reação final de 25  $\mu$ L. A amplificação do DNA foi realizada em um termociclador GeneAmp<sup>®</sup> PCR System 9.700 (Applied Biosystems, EUA), utilizando-se o ciclo de 95°C/2min, 30 ciclos de 95°C/1min, 50°C/1min e 72°C/1min e 72°C/5min.

Quadro 1– Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na RT-PCR para a detecção de mRNA dos FCoV<sub>s</sub>

<b>Primers</b>	<b>Orientação</b>	<b>Sequência (5'-3') *</b>	<b>Posição♦</b>	<b>Tamanho do fragmento</b>
RNA <sub>m</sub> A	Anti-senso	TAATRMCATARACGADCCAGCT	26440-26461	295pb
RNA <sub>m</sub> S	Senso	GTGCTAGVTTTGTCTTCGGACAMC	60-83	

Fonte: Hora et al. (2013).

Nota: ♦ Posição definida de acordo com o genoma FCoV-WSU 79-1146 (DQ010921).

Os produtos amplificados juntamente com um marcador de tamanho molecular (100pb DNA ladder, Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, EUA) foram dispostos em um gel de agarose a 1,5% corado com SYBR<sup>®</sup> Safe DNA Gel Stain (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, EUA) na diluição de 1:10.000 e submetidos à eletroforese em cuba horizontal com solução tampão de TBE, pH 8,0 (Tris-borato 0,045M:EDTA 0,001M). A banda observada foi comparada com o marcador de tamanho molecular e foi considerada positiva por apresentar banda de tamanho específico. O gel foi visualizado sob luz UV, a imagem obtida foi documentada, armazenada e analisada utilizando-se equipamento de fotodocumentação (Alpha Imager<sup>™</sup> Imaging System, Alpha Innotech, EUA).



## 8.4 Amplificação dos genes 3a-c, E e M dos FCoV

Foi utilizado apenas um par de *primers* descritos por Pedersen et al. (2009) para a amplificação de um fragmento longo, o qual incluiu os genes 3a-c, E e M dos FCoVs (Quadro 2).

Quadro 2 – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na RT-PCR para a detecção de dos genes 3a-c, E e M dos FCoVs

Orientação	Sequência (5'-3')	Posição*	Tamanho do Fragmento
Senso	GGCCTTGGTATGTGGCTAC	24380	2.617pb
Anti-senso	CTATTCCAATAACCAATTTGTTGATC	26996	

Fonte: Pedersen et al. (2009).

Nota: \*Posição definida de acordo com o genoma FCoV-WSU 79-1146 (DQ010921).

A síntese de cDNA foi realizada com a desnaturação de 6µL do RNA extraído, 50ng de *primers* randômicos, 1,6mM de cada dNTPs a 65°C durante 5 minutos, seguindo-se de banho de gelo. Então foram adicionados 5 x *cDNA synthesis Buffer* (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, EUA), 1,25mM de cada dNTP, 12,5mM DTT, 5U de RNaseOUT™, 1,875U de ThermoScript™ (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, EUA) e água DEPC q.s.p. 8µL. A RT foi submetida a 25°C/10min, 50°C/60min e 85°C/10min, em um termociclador GeneAmp® PCR System 9.700 (Applied Biosystems, EUA).

A seguir, o cDNA foi submetido à amplificação por PCR utilizando-se 5 µL de cDNA, os quais foram adicionados à 1x *PCR Buffer* (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, EUA), 2mM MgSO<sub>4</sub>, 0,2mM de cada dNTPs, 0,25µM de cada *primer*, 1,5U de Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, EUA), e água DEPC q.s.p. para uma reação final de 50µL. As condições térmicas da PCR foram de 94°C/2min, 10 ciclos de 94°C/15seg, 50°C/15seg com aumento de 0,5 °C a cada ciclo e 68°C/4min, 10 ciclos de 94°C/15seg, 55°C/15seg e 68°C/4min e mais 25 ciclos de 94°C/15seg, 55°C/15seg e 68°C/4min com aumento de 10 segundos a cada ciclo, com uma extensão final de 72°C/10min.

Os *amplicons* foram analisados após eletroforese em géis de agarose 1% corados com SYBR® Safe DNA Gel Stain (Life Technologies Corporation, Carlsbad,

CA, EUA) e comparados com um marcador de peso molecular (1Kb plus DNA Ladder, Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, EUA). Em seguida as bandas específicas foram excisadas dos géis e purificadas utilizando-se o kit Gene Jet Gel Extraction (Thermo Fisher Scientific Inc., Vilnius, Lituânia), segundo instruções do fabricante.

## 8.5 Clonagem

Os *amplicons* purificados foram submetidos à reação de ligação ao vetor pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector Systems (Promega, Madison, WI, EUA), conforme recomendações do fabricante. O plasmídeo recombinante foi então introduzido em bactérias competentes *Escherichia coli*, linhagem JM109, por meio da transformação físico-química. As bactérias transformadas foram plaqueadas em meio Luria Bertani sólido contendo ampicilina 100 µg/mL e em sua superfície: 0,5 mM de isopropil-β-D-tiogalactósido (IPTG) e 1 mg de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosídeo (X-Gal). As placas permaneceram incubando por 16 horas a 37°C. Após o período de incubação, foram selecionadas apenas as colônias brancas. O sucesso da clonagem foi confirmado por meio de PCR com *primers* específicos para o plasmídeo utilizado (Quadro 3). Em seguida foi realizada a eletroforese com gel de agarose 1% corado com SYBR<sup>®</sup> Safe DNA Gel Stain (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, EUA) para verificar quais amostras apresentavam bandas específicas correspondentes à parte do plasmídeo (230pb) mais o inserto (2.617pb).

Quadro 3 – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na PCR para a detecção do inserto e de parte do vetor

<b>Primers</b>	<b>Orientação</b>	<b>Sequência (5'-3')</b>	<b>Posição</b>
pGEM-TR	Anti-senso	CAGGAAACAGCTATGAC	176-197
pGEM-TF	Senso	GTTTTCCCAGTCACGAC	2949-2972

Fonte: Promega, 2013.

As colônias contendo o plasmídeo e o inserto de interesse foram selecionadas e adicionadas ao meio LB líquido, permanecendo em agitação a

180rpm, durante 16 horas, a 37°C. A partir deste material foi realizada a extração do plasmídeo com o inserto, utilizando-se um *kit* comercial (Illustra™ plasmidPrep Mini Spin Kit, GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido), segundo recomendações do fabricante. Em seguida, foi realizada a quantificação do plasmídeo extraído em espectrofotômetro (NanoDrop® Wilmington, Thermo Fisher Scientific DE, EUA), segundo instruções do fabricante.

## 8.6 Sequenciamento de DNA

Para este estudo, foram desenhados *primers* senso a cada aproximadamente 500pb, a fim de se obter uma cobertura total dos fragmentos longos clonados para o *amplicon* dos genes 3a-c, E e M (Quadro 4). Aliados aos *primers* desenhados, os oligonucleotídeos iniciadores para o plasmídeo também foram utilizados para que o sequenciamento atingisse as extremidades do produto clonado.

Quadro 4 – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados o cobertura total do sequenciamento dos fragmentos longos clonados

Primers	Sequência (5'-3')	Posição*
2B	YATYACWGTKTAYRABTT	487 - 505
3B	ACRACWYTNAKKTTTGTA	1058 - 1075
4B	AATAGCATTGCTAAATRT	1479 - 1496
5B	CGGCTTTAGTRTYGCAGG	1999 - 2008

Fonte: Hora, A.S. (2014).

Nota:\*Posição definida de acordo com o genoma FCoV-WSU 79-1146 (DQ010921).

Para a reação de sequenciamento de DNA foram utilizados 1 µL de BigDye 3 (BigDye® Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit, Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, EUA), tampão 1X, 0,5 µM de cada primer em reações em duplicatas separadas, 100 a 500 ng do clone selecionado e purificado e água ultrapura livre de DNase q.s.p. para uma reação final de 10 µL. As reações foram incubadas em um termociclador (Mastercycler® Gradient, Eppendorf, Hamburg, Alemanha) a

96°C/1min, 40 ciclos de 96°C/15min, 50°C/15min e 60°C/4min, com rampa de 1°C por segundo entre cada temperatura.

O produto desta reação foi precipitado à temperatura ambiente com 2,5µL de EDTA a 125mM e 30 µL de etanol absoluto, seguido de homogeneização e incubação por 15 minutos, em temperatura ambiente. Em seguida, a solução foi centrifugada a 2.250xg, durante 45 minutos a 4°C e após o sobrenadante foi removido. Então, adicionou-se 75 µL de etanol 70% e o material foi centrifugado a 2.250xg, durante 15 minutos a 4°C, em seguida o sobrenadante foi desprezado. O *pellet* permaneceu por 10 minutos a 94°C para a secagem completa. Após a precipitação, as sequências foram obtidas em sequenciador capilar Genetic Analyser 3500™ (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

## 8.7 Edição das sequências

Os cromatogramas gerados para cada uma das sequências, em duplicata, de cada amostra foram avaliados com relação à sua qualidade das bases sequenciadas no aplicativo Phred online (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>). Utilizaram-se apenas os fragmentos com escore superior a 20 (probabilidade de um erro a cada 100 nucleotídeos). Os cromatogramas foram analisados e editados manualmente com o programa FinchTV v. 1.4 (<http://www.geopiza.com/finchtv>) com a finalidade de observar e corrigir possíveis erros de interpretação e discrepâncias entre cada uma das fitas sequenciadas. As sequências finais de cada amostra foram obtidas com o aplicativo Cap-contig do programa computacional BioEdit v. 7.0.9.0 (HALL, 1999), e submetidas a análise entre os diferentes clones de cada amostra em busca de avaliar as diferenças entre cada uma.

A pesquisa de similaridade dentre as sequências deste estudo com outras sequências depositadas no GenBank foi realizada utilizando-se o programa Blast 2.0.10 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>).

## 8.8 Análises filogenéticas

Os alinhamentos de nucleotídeos e de aminoácidos dos genes 3a-c, E e M foram realizados por meio do aplicativo Clustal W do programa computacional BioEdit v. 7.0.9.0 (HALL, 1999). Com o uso do mesmo programa, por meio do aplicativo *Sequence Identity Matrix* foram obtidas as matrizes de identidade de nucleotídeos e de aminoácidos. As matrizes de identidade de nucleotídeos foram utilizadas para se avaliar a diversidade gênica entre os clones e entre amostras. As sequências de aminoácidos obtidas do gene 3a foram comparadas com sequências de referência obtidas do Genbank para a classificação das amostras deste estudo nos sorotipos I ou II dos FCoV.

Árvores filogenéticas foram construídas utilizando-se o programa computacional Mega versão 5.05 (TAMURA et al., 2011). As árvores geradas a partir das sequências nucleotídicas foram construídas pelo método de *Neighbor-Joining* através do modelo de substituição *Maximum Composite Likelihood*, utilizando-se os valores de “*bootstrap*” de 1.000 repetições, cujos valores maiores ou iguais a 50 foram apresentados próximos aos nós.

## **9 RESULTADOS**

### **9.1 RT-PCR para a detecção do RNAm do gene M dos FCoV**

Dentre as amostras coletadas dos gatos com PIF, a positividade para o RNAm dos FCoVs variou de 11,76 a 92,31% por animal (Apêndice B). Um total de cinco amostras de fezes foi obtido de animais sem PIF; dessas, três gatos (Beth, Raji e Sofia) foram provenientes do mesmo domicílio, onde os gatos apresentaram um surto de diarreia. Desses, não foi possível a amplificação do RNAm dos FCoVs em apenas uma amostra (gata Beth).

### **9.2 Amplificação, sequenciamento e análise filogenética dos genes 3a-c, E e M**

Não foi possível a amplificação e a clonagem do fragmento longo (genes 3a-c, E e M) de uma amostra de órgão extraintestinal e uma de fezes ou intestino de todos os 18 gatos PIF+, dos quais a clonagem de uma amostra tecidual e outra entérica foi obtida de três gatos com PIF e de outros três gatos, apenas de amostras teciduais foram obtidas. Nenhum dos gatos PIF+ deste estudo era contactante, com exceção dos gatos Arthur e Rebeca que moravam no mesmo domicílio. Dentre os gatos PIF-, foi possível a clonagem e sequenciamento das amostras fecais apenas de dois gatos (Tabela 3).

Tabela 3 - Nome e localidade dos gatos, classificação de acordo com a presença de PIF, detecção do RNAm dos FCoV e número de clones obtidos

Nome	Localidade	PIF	Amostra	RNAm	Número de clones obtidos de acordo com os genes				
					E 249pb	M 792pb	3a 213pb	3b 222pb	3c 714pb
<b>Raji</b>	1	Não	Fezes		4	6	6	6	4
<b>Arthur</b>	2	PIF efusiva	Cérebro	Neg	3	5	8	8	8
			Intestino Grosso	Pos	3	1	4	4	2
<b>Rebeca</b>	2	PIF efusiva	Cérebro	Pos	2	3	3	3	2
<b>Coockie</b>	3	PIF seca	Cérebro	Neg	5	5	5	5	2
			Fezes	Pos	3	6	10	10	5
<b>Cris</b>	4	Não	Fezes		1	1	12	12	9
<b>Hope</b>	5	PIF efusiva	Cérebro	Pos	0	6	9	9	9
<b>Leide</b>	6	PIF efusiva	Estômago	Pos	1	1	1	1	1
			Bexiga	Pos	0	0	3	3	2
<b>Mile</b>	7	PIF seca	Estômago	Pos	10	11	10	9	6
			Fezes	Neg	0	3	8	7	5
<b>TOTAL DE CLONES (n= 286)</b>					<b>38</b>	<b>43</b>	<b>79</b>	<b>69</b>	<b>55</b>

Fonte: Hora, A.S. (2014).

Nota: Pos, positivo; Neg, negativo.

As amostras foram classificadas em sorotipos com base na análise comparativa entre as sequências de aminoácidos codificados pelo gene 3a deste estudo, com as sequências disponíveis no GenBank (sorotipo I: DQ160294 e DQ848678 e sorotipo II: DQ 010921). Observou-se que todos os clones obtidos do presente estudo pertenceram ao sorotipo I (Tabela 4); a identidade média de aminoácidos foi de 88,41% para o sorotipo I e de 66,50% para o sorotipo II.

Tabela 4 - Média de identidade de aminoácidos codificados pelo gene 3a entre os clones obtidos das amostras deste estudo e as sequências de referência dos sorotipos I (DQ160294 e DQ848678) e II (DQ01092)

Gato	Sorotipo I	Sorotipo II	Núm. de clones
<b>Raji</b>	91,86%	65,87%	6
<b>Arthur</b>	86,14%	63,65%	12
<b>Coockie</b>	84,86%	63,55%	15
<b>Cris</b>	88,88%	66,26%	12
<b>Hope</b>	89,87%	68,30%	9
<b>Leide</b>	90,14%	66,85%	4
<b>Mile</b>	90,57%	67,52%	18
<b>Rebeca</b>	86,40%	65,43%	3
<b>TOTAL</b>	<b>88,41%</b>	<b>66,50%</b>	<b>79</b>

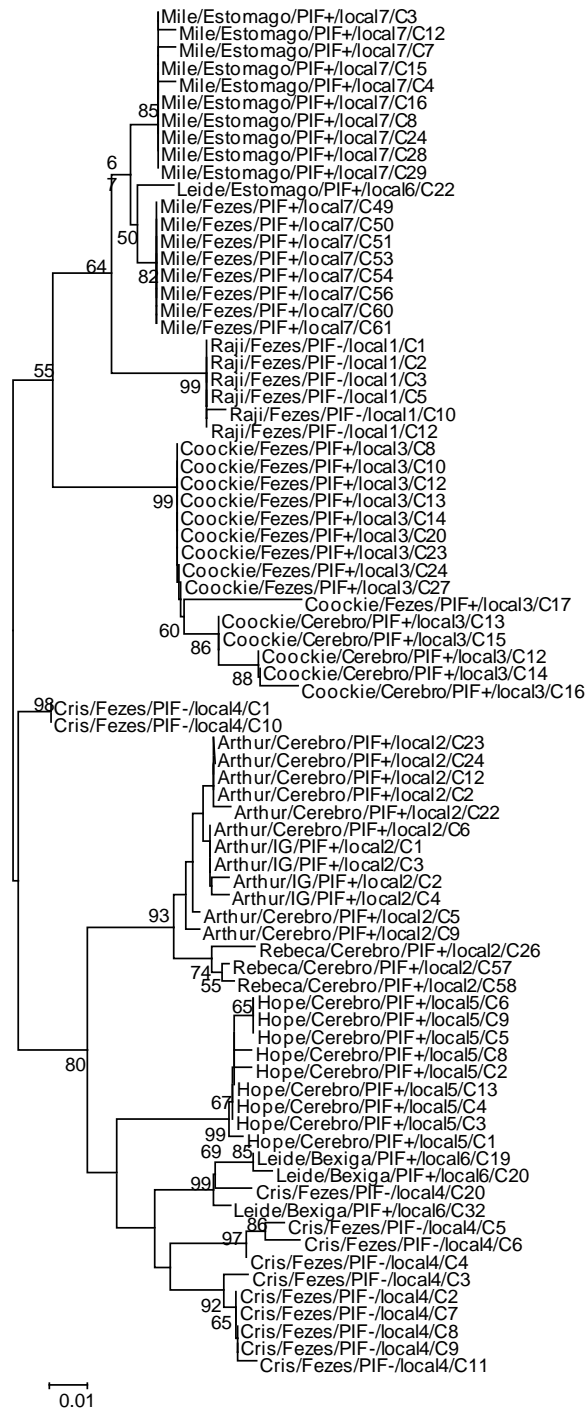
Fonte: Hora, A.S. (2014).

Ao se avaliar a árvore filogenética gerada com o gene 3a (Figura 4), observou-se que houve diferença entre as linhagens obtidas de amostras teciduais e fecais de FCoV entre os clones do mesmo animal, ou seja, para cada animal, houve distinção entre linhagens sistêmicas e entéricas. Entretanto, não foi observado nenhum agrupamento genérico por patótipo (FECoV ou FIPV). Esses mesmos padrões de segregação foram observados nas árvores geradas a partir dos clones obtidos dos genes 3c, E e M (Figuras 5 a 8). A árvore do gene 3b (Figura 5) apresentou uma topologia diferente das outras árvores no que se refere às amostras de fezes e cérebro do gato Cookie (PIF+), as quais não apresentaram diferenciação entre as linhagens, entérica e sistêmica.

Em alguns casos, como observado por meio dos clones provenientes dos gatos Arthur, Leide (ambos PIF+) e Cris (PIF-), observou-se uma alta diversidade clonal, independente de esses animais apresentarem ou não PIF (Figuras 4 a 8). Já em outros casos, como os clones provenientes do gato Mile, uma menor variabilidade foi observada (Figuras 4 a 8).

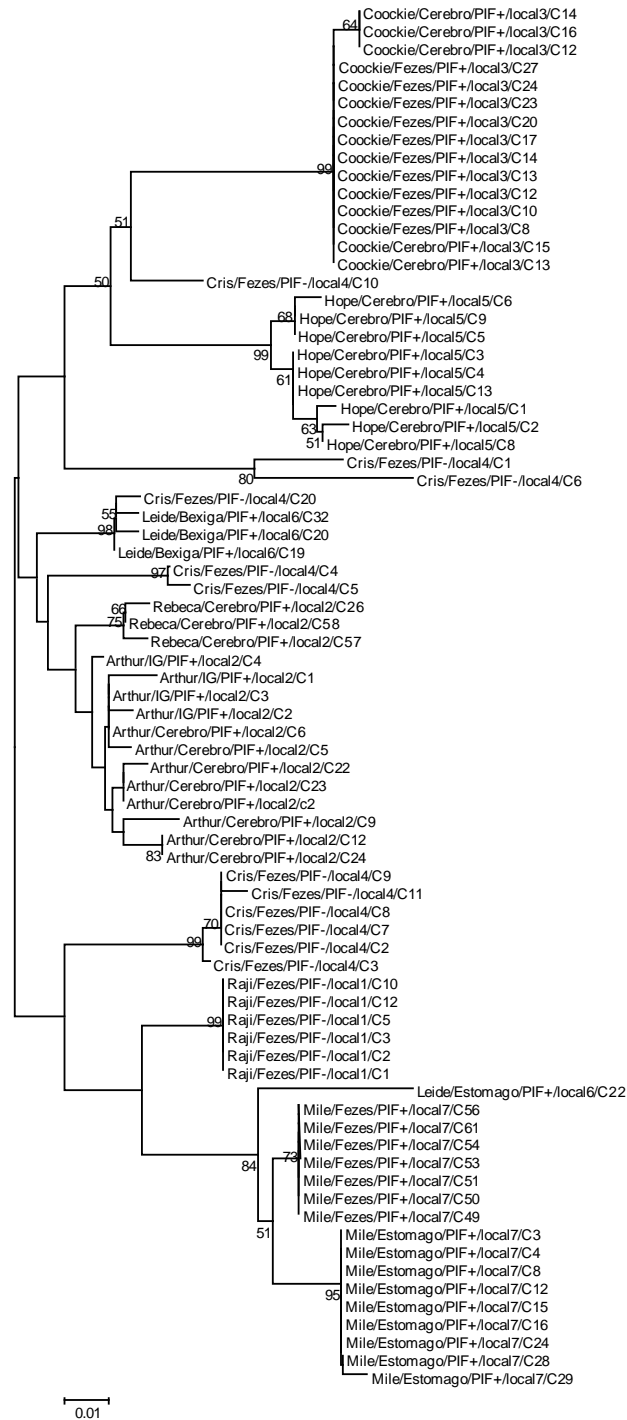


Figura 4 - Árvore filogenética construída com o método de Neighbor-Joining através do modelo de substituição *maximum composite likelihood* (Software *Mega v. 5.05*) do gene 3a do coronavírus felino. Os números próximos a cada nó representam os valores de 1.000 repetições de “*bootstrap*”, sendo demonstrados apenas aqueles superiores a 50%. A escala representa o número de substituições/sítio. As amostras estão identificadas com o nome do animal/procedência da amostra/local de domicílio/número do clone



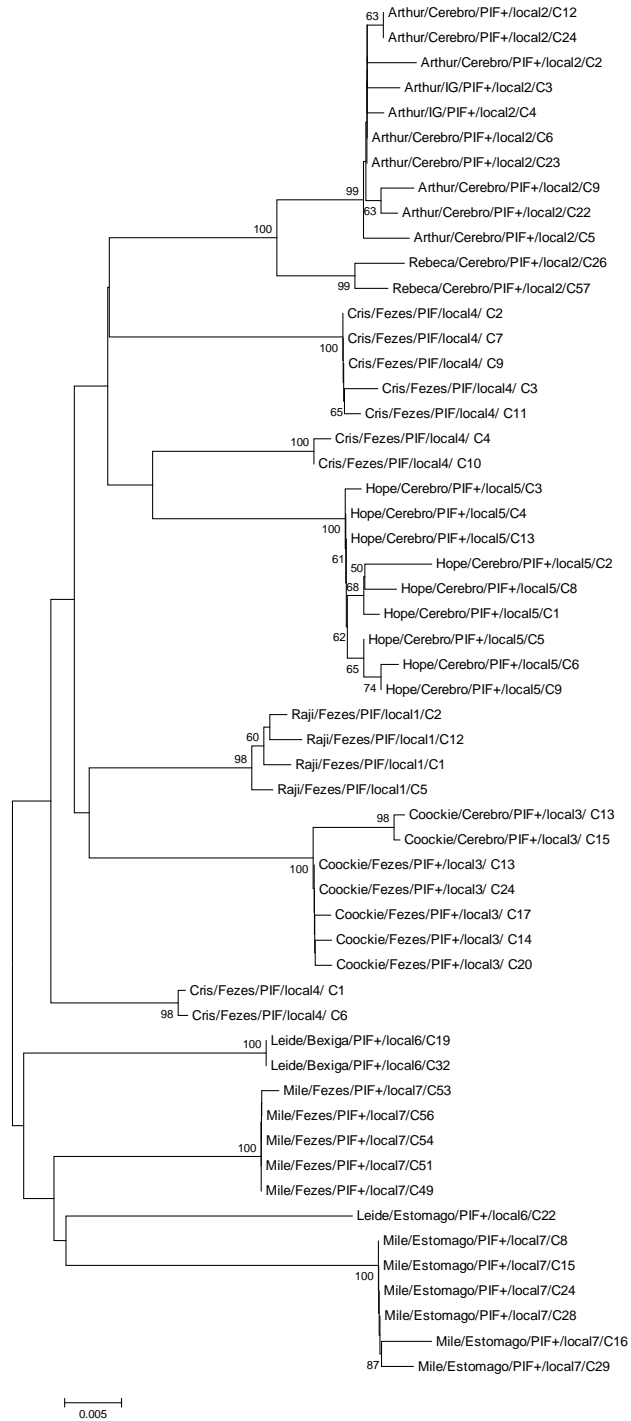
Fonte: Hora, A.S. (2014).

Figura 5 - Árvore filogenética construída com o método de Neighbor-Joining através do modelo de substituição *maximum composite likelihood* (*Software Mega v. 5.05*) do gene 3b do coronavírus felino. Os números próximos a cada nó representam os valores de 1.000 repetições de “*bootstrap*”, sendo demonstrados apenas aqueles superiores a 50%. A escala representa o número de substituições/sítio. As amostras estão identificadas com o nome do animal/procedência da amostra/local de domicílio/número do clone



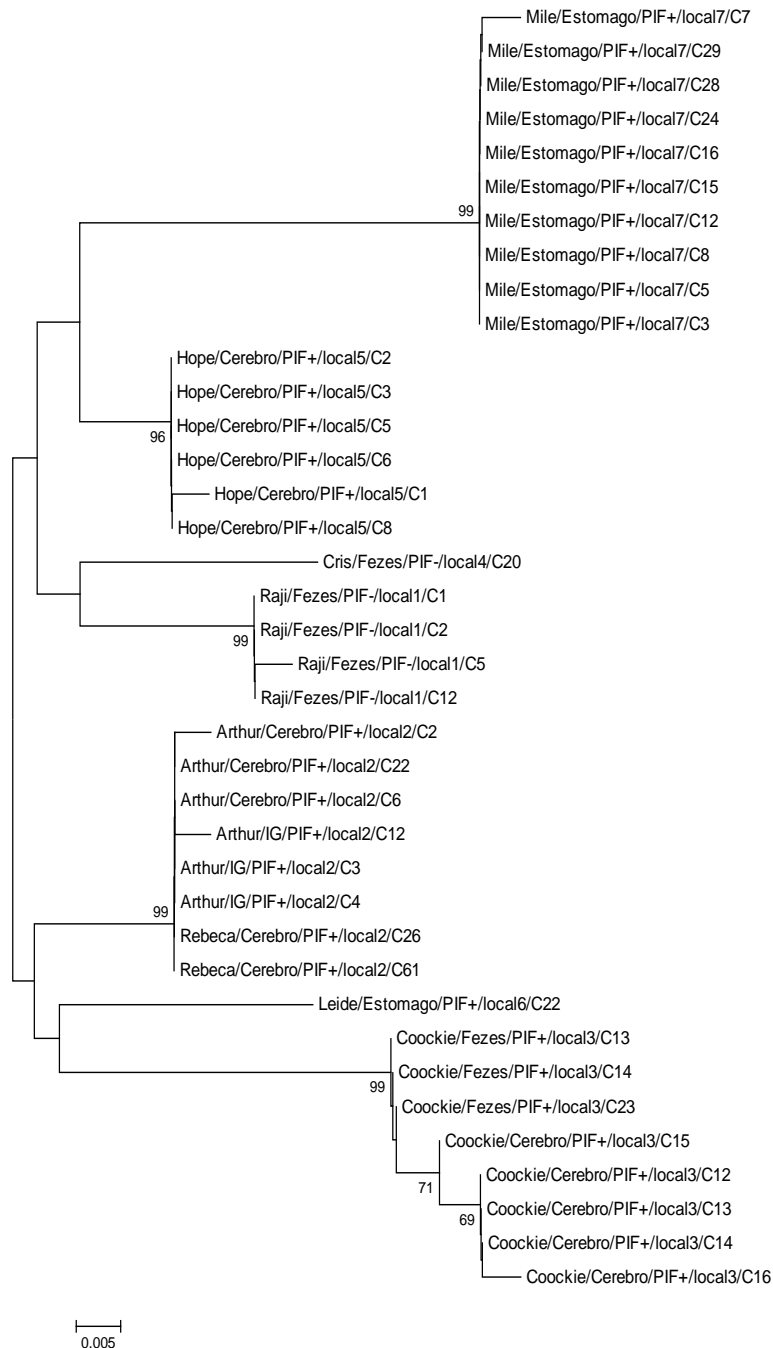
Fonte: Hora, A.S. (2014).

Figura 6 - Árvore filogenética construída com o método de Neighbor-Joining através do modelo de substituição *maximum composite likelihood* (*Software Mega v. 5.05*) do gene 3c do coronavírus felino. Os números próximos a cada nó representam os valores de 1.000 repetições de “*bootstrap*”, sendo demonstrados apenas aqueles superiores a 50%. A escala representa o número de substituições/sítio. As amostras estão identificadas com o nome do animal/procedência da amostra/local de domicílio/número do clone.



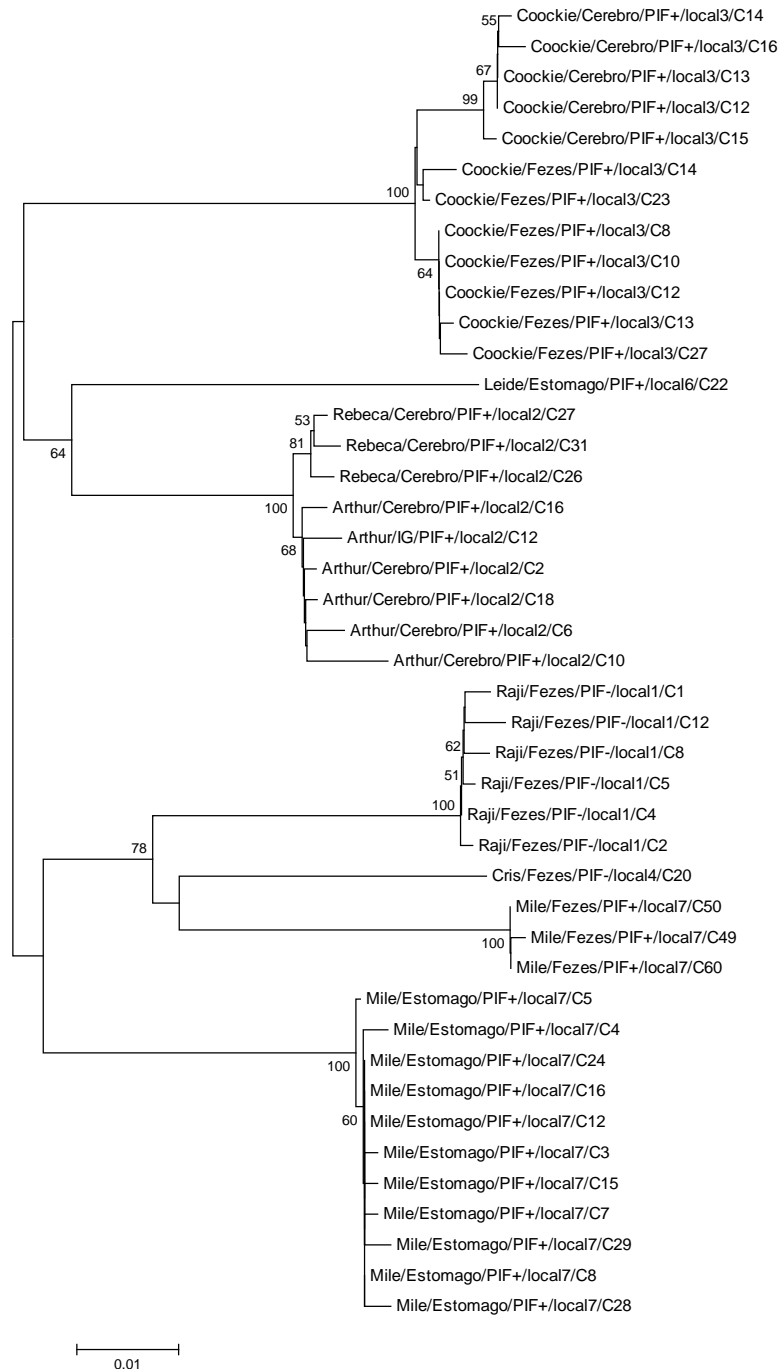
Fonte: Hora, A.S. (2014).

Figura 7 - Árvore filogenética construída com o método de Neighbor-Joining através do modelo de substituição *maximum composite likelihood* (*Software Mega v. 5.05*) do gene E do coronavírus felino. Os números próximos a cada nó representam os valores de 1.000 repetições de “*bootstrap*”, sendo demonstrados apenas aqueles superiores a 50%. A escala representa o número de substituições/sítio. As amostras estão identificadas com o nome do animal/procedência da amostra/local de domicílio/número do clone



Fonte: Hora, A.S. (2014).

Figura 8 - Árvore filogenética construída com o método de Neighbor-Joining através do modelo de substituição *maximum composite likelihood* (*Software Mega v. 5.05*) do gene M do coronavírus felino. Os números próximos a cada nó representam os valores de 1.000 repetições de “*bootstrap*”, sendo demonstrados apenas aqueles superiores a 50%. A escala representa o número de substituições/sítio. As amostras estão identificadas com o nome do animal/procedência da amostra/local de domicílio/número do clone



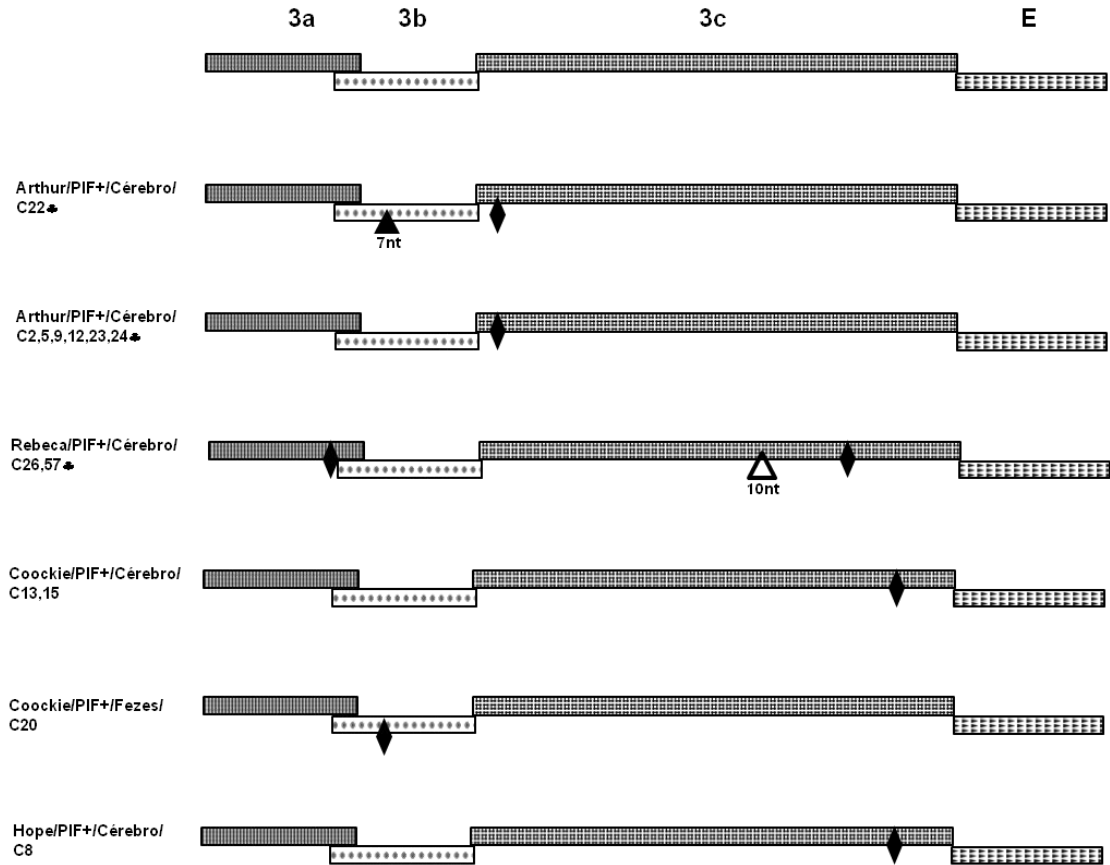
Fonte: Hora, A.S. (2014).

A identidade geral de nucleotídeos de todos os clones obtidos dos cinco genes para as amostras fecais foi  $\geq 92,09\%$  e para as amostras teciduais foi  $\geq 90,09\%$  (Apêndice C e D). A maior variabilidade gênica foi observada no gene 3b, do qual foi notada a menor identidade de nucleotídeos (90,09%) dentre todos os genes sequenciados, exceto ao se compararem os gatos domiciliados na mesma residência, para os quais a identidade entre as sequências obtidas do gene 3b foi de 97,09%.

Para as amostras teciduais e fecais, o gene 3a foi o mais conservado (identidades de nucleotídeos de 99,38% e 97,70%, respectivamente). A identidade média entre as amostras dos dois gatos contactantes (Arthur e Rebeca) foi de 96,17% (gene 3c) a 99,83% (gene E).

Dentre todos os genes sequenciados, foi observada a presença de *stop* códons prematuros nos genes 3a (Rebeca, 3/3 clones), 3b (Arthur, 1/8; Cookie, 1/10), 3c (Arthur, 10/10; Rebeca 2/2; Cookie 2/2; Hope, 1/9; Leide 1/3; Mile 6/6) e M (Raji, 1/6; Cookie 1/5). (Figura 9). Nenhum *stop* códon prematuro nos genes 3a-c ou E foi observado nas amostras fecais provenientes dos gatos sem PIF. Ao se avaliar o gene 3c, foi evidente a presença de *stop* códons em pelo menos um dos clones de amostras teciduais de gatos com PIF, enquanto que as amostras fecais de gatos com ou sem PIF não apresentaram esse gene truncado em nenhum dos clones. Nenhum outro marcador molecular que permitisse a diferenciação entre os biótipos (FECoV e FIPV) foi observado nos genes sequenciados.

Figura 9 - Representação esquemática dos genes 3a-c, E e M de clones que apresentaram *stop* códon. As sequências representadas foram obtidas de gatos com PIF, o número do clone e o órgão de origem estão descritos na figura. As deleções que ocasionaram *stop* códon prematuros estão indicadas com triângulos pretos, as substituições que acarretaram em *stop* códon prematuros estão indicadas com losangos pretos e as deleções representadas por triângulos vazados



Fonte: Hora, A.S. (2014).

## 10 DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

No presente estudo, clones de genes estruturais (E e M) e acessórios (3a-c) foram obtidos de amostras provenientes de órgãos extraintestinais de seis gatos com PIF. Desses mesmos animais, também foram obtidas amostras do intestino de um gato e de fezes de outros dois gatos. Adicionalmente amostras fecais de dois gatos sem PIF foram utilizadas com a finalidade de se avaliar a constituição das quasiespécies virais.

A detecção do RNAm do gene M dos FCoV foi utilizada neste estudo como uma forma de confirmar o diagnóstico histopatológico de PIF. Essa técnica molecular baseia-se no ponto chave da patogenia do FIPV que é detecção da replicação sistêmica em monócitos e macrófagos e não na simples identificação do RNA genômico viral (SIMONS et al., 2005). No presente estudo, a positividade para o RNAm em diversas amostras variou de 11 a 92% por gato, essa diferença pode estar relacionada com a fase da doença de cada animal, que pode levar a alternância entre presença e ausência de replicação e, portanto, detecção de RNAm viral.

O FECoV apresenta uma fase intestinal e uma sistêmica, que envolve a replicação em macrófagos (PEDERSEN et al., 2012). O gato Cris (PIF-) mesmo com evidente estado clínico grave por complicações respiratórias decorrentes do complexo respiratório viral felino e subsequente óbito, não apresentou positividade para o RNAm dos FCoVs em nenhuma amostra extrafecal. Até o momento da redação deste trabalho, o outro gato PIF- (Raji) não desenvolveu manifestações clínicas de PIF.

Chang et al. (2010) apontaram que a maioria dos gatos com PIF não apresenta FCoVs detectáveis no intestino e que aparentemente a infecção primária foi eliminada, assim como observado no presente estudo, onde o RNAm dos FCoVs foi detectado em apenas 38,89% (7/18) das amostras fecais obtidas dos gatos PIF+. Possivelmente, nos estágios precoces da PIF, a infecção sistêmica ativa mecanismos imunes que levam à eliminação do vírus do intestino (DE GROOT-MIJNES et al., 2005).

A classificação em sorotipos pode ser realizada com base na análise das proteínas dos genes S e 3a, contudo tal classificação é mais facilmente obtida com o



gene 3a por ser muito menor (71 aa para 3a e 1.471 aa para S) e menos variável geneticamente (PEDERSEN et al., 2009). No presente estudo, todas as amostras pertenceram ao sorotipo I com base na análise realizada levando-se em consideração a identidade de aminoácidos do gene 3a.

O sorotipo I é o mais amplamente disseminado na população felina (ADDIE et al., 2003; BENETKA et al., 2004; KUMMROW et al., 2005) e é o mais difícil de ser isolado em cultivo celular (DRECHSLER et al., 2011). Esse sorotipo é denominado como vírus “totalmente” felino, já que não é resultado de uma recombinação com o coronavírus canino (CCoV) como o sorotipo II (HERREWEGH et al., 1998).

Foi possível a clonagem e sequenciamento de amostras de cérebro e intestino grosso (IG) do gato Arthur (PIF+); ao se avaliar os clones obtidos, evidenciou-se que a identidade de nucleotídeos foi superior a 99% e que nas árvores filogenéticas geradas os clones deste gato resultaram em um mesmo cluster. No gene 3c, foi observada uma transversão de nucleotídeos (de G para T) na posição 10 do gene em todos os clones de ambas as amostras desse gato, resultando em *stop* códons precoces e conseqüentemente, em proteínas truncadas, o que não é observado com o FECoV segundo outros estudos (PEDERSEN et al., 2009; CHANG et al., 2010; HSIEH et al., 2013).

Possivelmente, por se tratar de um órgão alvo de replicação viral e conseqüentemente, alterações patológicas também nos quadros de PIF, o intestino estava acometido também pela linhagem sistêmica no caso do gato Arthur (PIF+). Chang et al. 2010 sugeriram que os vírus que apresentam o gene 3c inativado raramente se replicam no intestino, justificando a rara incidência de surtos de PIF. Um *stop* códon precoce no gene 3c foi observado em uma amostra de jejuno de um gato com PIF, e a mesma linhagem intestinal apresentou 100% de identidade com a obtida de uma amostra de fígado do mesmo gato (DYE; SIDDELL, 2007). Em estudos recentes (PEDERSEN et al., 2012; HSIEH et al., 2013), foi detectado o gene 3c com uma terminação prematura em amostras fecais e extraintestinais de gatos com PIF, porém não foi determinado se os vírus estavam em replicação. Contudo, no presente estudo, a mesma amostra de IG do gato Arthur, da qual os clones estudados foram oriundos, foi positiva para o RNAm dos FCoV, evidenciando replicação viral, tornando possível a disseminação do patótipo FIPV pelas fezes.

Ao se comparar as sequências dos órgãos extraintestinais com as fezes dos gatos Cookie e Mile, ambos PIF+, não foi observada a presença de *stop* códon prematuro no gene 3c das amostras fecais de ambos os gatos, diferente do observado nos clones teciduais dos mesmos. A identidade de nucleotídeos do gene 3c para as amostras teciduais e fecais foi de 99,09% e 95,58% para os gatos Cookie e Mile, respectivamente.

Em um estudo que comparou o FCoV de lesões extraintestinais de PIF e de fezes do mesmo gato, observou-se que a identidade entre as sequências dos genes estruturais e acessórios avaliados (S, M, N, E, 3a-c, 7a-b) sempre foi maior que 99% corroborando com a teoria da mutação *in vivo* (PEDERSEN et al., 2009). Como supostamente a linhagem FIPV é derivada por mutações da FECoV, esperava-se que a variação de identidade nucleotídica entre as fezes e a amostra tecidual do gato Mile fosse menor. Porém essa diferença atingiu uma diferença de 8,84% no gene 3b, o que significa que este gato poderia estar coinfestado com outra linhagem de FCoV, distinta da sistêmica. Já a alta identidade nucleotídica entre a amostra de cérebro e fezes do gato Cookie juntamente com a topologia das árvores geradas evidenciaram que a infecção primária intestinal em alguns casos pode ser mantida mesmo durante a PIF, inclusive em replicação (RNA<sup>m+</sup>).

Dentre os genes estruturais aqui estudados, *stop* códons prematuros foram observados apenas no gene M. A proteína M dos FCoVs é a proteína estrutural mais abundante, apresenta importantes funções na ligação do vírus à célula do hospedeiro (ROTTIER, 1995). A presença de *stop* códon prematuro em um gene constitutivo, como o gene M, é incompatível com a funcionalidade do vírion. Este vírion defectivo não é menos importante que os outros, à medida que disponibiliza material genético para a recombinação com outros FCoVs, resultando em uma maior diversidade gênica e, possivelmente, em maior virulência de algumas quasiespécies.

Dados sugerem que os produtos dos genes 3a-c são pré-requisitos para a replicação do patótipo avirulento no trato entérico, mas alterações gênicas nesta região podem aumentar o *fitness* do vírus em replicação nos macrófagos e monócitos (CHANG et al., 2010; BALINT et al., 2012). A maioria das mutações observada ocorre no gene 3c do FIPV, mas também podem ser notadas nos genes 3a e 3b (VENNEMA et al., 1998; CHANG et al., 2010; PEDERSEN et al., 2012).

Estudos mais recentes sugerem que o gene 3c, que codifica uma pequena proteína (238 aa) de função desconhecida, está correlacionado com a maioria dos isolados de FIPV quando presente na forma truncada, porém nem todas as amostras FIPV+ apresentam-se nesta forma (PEDERSEN et al., 2009; CHANG et al., 2010; HSIEH et al., 2013). No presente estudo, a proteína 3c truncada foi observada em todos os clones obtidos de amostras teciduais de gatos PIF+, com exceção dos clones obtidos do animal Hope, do qual apenas 11% (1/9) dos clones possuíam a proteína truncada.

É fundamental notar que o fato de apenas uma minoria das sequências observadas no cérebro do gato Hope possuir o gene 3c truncado poderia não ter sido detectado se o presente estudo avaliasse apenas a população viral predominante por meio de sequenciamento direto do *amplicon*, sem a aplicação da técnica de clonagem, como ocorreu nos estudos realizados até o momento por outros autores (PEDERSEN et al., 2009; CHANG et al., 2010; PEDERSEN et al., 2012; HSIEH et al., 2013). Em infecção experimental, a pressão para que a proteína 3c seja truncada é evidente (PEDERSEN et al., 2009). Pedersen et al. (2012) sugeriram que as mutações que causam a PIF não se iniciam com a terminação precoce da proteína 3c, portanto possivelmente o gato Hope (PIF+) poderia estar numa fase precoce da infecção, por apresentar apenas um clone do gene 3c truncado.

As transversões observadas na posição 10 do gene 3c, que resultaram em *stop* códon precoce, foram as mesmas observadas nas quasiespécies obtidas do cérebro e do estômago dos gatos Arthur e Mile, respectivamente. Com exceção desse fato, em concordância com o observado por Pedersen et al. (2009; 2012), as mutações foram únicas de cada gato no gene 3c, incluindo as sequências obtidas dos gatos PIF+ contactantes (Arthur e Rebecca).

A comparação entre os genes 3a-c, E e M e suas proteínas de amostras de gatos com e sem PIF realizada por este estudo não evidenciou nenhuma diferença consistente com o patotipo, com exceção do gene 3c. Nem mesmo os marcadores gênicos observados por Brown et al. (2009) no gene M, os quais supostamente distinguiriam os patotipos de FCoV, um evento também já descrito em outros estudos (CHANG; EGBERINK; ROTTIER, 2011; PEDERSEN et al., 2012; HORA et al., 2013).

Conclui-se que linhagens FIPV de coronavírus felino deste estudo apresentaram a proteína 3c truncada, havendo para os genes 3a-c, E e M diversidade gênica que confere a constituição das quasiespécies de coronavírus felino e a probabilidade de emergência do biótipo de alta virulência, mas de um modo hospedeiro-específico.

## 11 CONCLUSÕES

1. Gatos com PIF podem disseminar o FCoV pelas fezes sem distinção entre os patótipos FECoV e FIPV. Assim como ocorre com os coronavírus que infectam outros hospedeiros, os FCoVs também podem ser disseminados pela urina.
2. Ambas as hipóteses de mutação *in vivo* e da circulação de linhagens de FCoVs de alta e baixa virulência são plausíveis.
3. Os genes 3a-c, E e M de coronavírus felino sorotipo I apresentam diversidade gênica que confere a constituição das quasiespécies de coronavírus felino e a probabilidade de emergência do biótipo de alta virulência, mas de um modo hospedeiro-específico.
4. Linhagens FIPV de coronavírus felino podem apresentar a proteína 3c truncada, sendo o gene 3c o único marcador de patótipo dos FCoVs observado dentre os genes estudados (3a-c, E e M).

## REFERÊNCIAS

- ADDIE, D.; JARRETT, O. Control of feline coronavirus infection in kittens. **Vet Rec**, v. 126, n. 7, p. 164, 1990.
- ADDIE, D.; JARRETT, O. Feline coronavirus antibodies in cats. **Vet Rec**, v. 131, n. 9, p. 202-203, 1992a.
- ADDIE, D.; JARRETT, O. A study of naturally occurring feline coronavirus infections in kittens. **Vet Rec**, v. 130, n. 7, p. 133-137, 1992b.
- ADDIE, D.; TOTH, S.; MURRAY, G. D.; JARRETT, O. Risk of feline infectious peritonitis in cats naturally infected with feline coronavirus. **Am J Vet Res**, v. 56, n. 4, p. 429-434, 1995.
- ADDIE, D. Clustering of feline coronaviruses in multicat households. **Vet J**, v. 159, n. 1, p. 8-9, 2000.
- ADDIE, D.; DENNIS, J. M.; TOTH, S.; CALLANAN, J. J.; REID, S.; JARRETT, O. Long-term impact on a closed household of pet cats of natural infection with feline coronavirus, feline leukaemia virus and feline immunodeficiency virus. **Vet Rec**, v. 146, n. 15, p. 419-424, 2000.
- ADDIE, D.; JARRETT, O. Use of a reverse-transcriptase polymerase chain reaction for monitoring the shedding of feline coronavirus by healthy cats. **Vet Rec**, v. 148, n. 21, p. 649-653, 2001.
- ADDIE, D.; SCHAAP, I. A.; NICOLSON, L.; JARRETT, O. Persistence and transmission of natural type I feline coronavirus infection. **J Gen Virol**, v. 84, pt. 10, p. 2735-2744, 2003.
- ADDIE, D.; PALTRINIERI, S.; PEDERSEN, N. C. Recommendations from workshops of the second international feline coronavirus/feline infectious peritonitis symposium. **J Feline Med Surg**, v. 6, n. 2, p. 125-130, 2004.
- ADDIE, D.; JARRETT, O. Feline Coronavirus Infections. In: GREENE, C. E. (Ed.). **Infectious diseases of the dog and cat**. St. Louis: Saunders Elsevier, 2006, p.88-102.
- ADDIE, D.; BELAK, S.; BOUCRAUT-BARALON, C.; EGBERINK, H.; FRYMUS, T.; GRUFFYDD-JONES, T.; HARTMANN, K.; HOSIE, M. J.; LLORET, A.; LUTZ, H.; MARSILIO, F.; PENNISI, M. G.; RADFORD, A. D.; THIRY, E.; TRUYEN, U.; HORZINEK, M. C. Feline infectious peritonitis. ABCD guidelines on prevention and management. **J Feline Med Surg**, v. 11, n. 7, p. 594-604, 2009.
- ADDIE, D. Feline Coronavirus Infectious. In: GREENE, C. E. (Ed.). **Infectious diseases of the dog and cat**. St Louis, Missouri: Elsevier Saunders, 2012.

- BALINT, A.; FARSANG, A.; ZADORI, Z.; HORNYAK, A.; DENCSCO, L.; ALMAZAN, F.; ENJUANES, L.; BELAK, S. Molecular characterization of feline infectious peritonitis virus strain DF-2 and studies of the role of ORF3abc in viral cell tropism. **J Virol**, v. 86, n. 11, p. 6258-6267, 2012.
- BENETKA, V.; KUBBER-HEISS, A.; KOLODZIEJEK, J.; NOWOTNY, N.; HOFMANN-PARISOT, M.; MOSTL, K. Prevalence of feline coronavirus types I and II in cats with histopathologically verified feline infectious peritonitis. **Vet Microbiol**, v. 99, n. 1, p. 31-42, 2004.
- BROWN, M. A.; TROYER, J. L.; PECOON-SLATTERY, J.; ROELKE, M. E.; O'BRIEN, S. J. Genetics and pathogenesis of feline infectious peritonitis virus. **Emerg Infect Dis**, v. 15, n. 9, p. 1445-1452, 2009.
- BROWN, M. A. Genetic determinants of pathogenesis by feline infectious peritonitis virus. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 143, n. 3-4, p. 265-268, 2011.
- CARSTENS, E. B. Ratification vote on taxonomic proposals to the international committee on taxonomy of viruses (2009). **Arch. Virol.**, v. 155, n., p. 133–146, 2010.
- CAVANAGH, D. *Coronaviridae*: a review of coronaviruses and toroviruses. In: Schmidt, A., Weber, O., *et al* (Ed.). **Coronaviruses with Special Emphasis on First Insights Concerning SARS**. Basel: Birkhäuser Verlag Basel/Switzerland, 2005, p.1-54.
- CAVANAGH, D. Coronavirus avian infectious bronchitis virus. **Vet Res**, v. 38, n. 2, p. 281-297, 2007.
- CHAN, K. H.; POON, L. L.; CHENG, V. C.; GUAN, Y.; HUNG, I. F.; KONG, J.; YAM, L. Y.; SETO, W. H.; YUEN, K. Y.; PEIRIS, J. S. Detection of SARS coronavirus in patients with suspected SARS. **Emerg Infect Dis**, v. 10, n. 2, p. 294-299, 2004.
- 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. **J Gen Virol**, v. 91, n. Pt 2, p. 415-420, 2010.
- CHANG, H. W.; EGBERINK, H. F.; ROTTIER, P. J. Sequence analysis of feline coronaviruses and the circulating virulent/avirulent theory. **Emerg Infect Dis**, v. 17, n. 4, p. 744-746, 2011.
- CHANG, H. W.; EGBERINK, H. F.; HALPIN, R.; SPIRO, D. J.; ROTTIER, P. J. Spike protein fusion peptide and feline coronavirus virulence. **Emerg Infect Dis**, v. 18, n. 7, p. 1089-1095, 2012.
- DE GROOT-MIJNES, J. D.; VAN DUN, J. M.; VAN DER MOST, R. G.; DE GROOT, R. J. Natural history of a recurrent feline coronavirus infection and the role of cellular immunity in survival and disease. **J Virol**, v. 79, n. 2, p. 1036-1044, 2005.

- DEDEURWAERDER, A.; OLYSLAEGERS, D. A.; DESMARETS, L. M.; ROUKAERTS, I. D.; THEUNS, S.; NAUWYNCK, H. J. ORF7-encoded accessory protein 7a of feline infectious peritonitis virus as a counteragent against IFN-alpha-induced antiviral response. **J Gen Virol**, v. 95, pt. 2, p. 393-402, 2014.
- DEWERCHIN, H. L.; CORNELISSEN, E.; NAUWYNCK, H. J. Replication of feline coronaviruses in peripheral blood monocytes. **Arch Virol**, v. 150, n. 12, p. 2483-2500, 2005.
- DOMINGO, E.; SHELDON, J.; PERALES, C. Viral quasispecies evolution. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 76, n. 2, p. 159-216, 2012.
- DRECHSLER, Y.; ALCARAZ, A.; BOSSONG, F. J.; COLLISSON, E. W.; DINIZ, P. P. Feline coronavirus in multicat environments. **Vet Clin North Am Small Anim Pract**, v. 41, n. 6, p. 1133-1169, 2011.
- DYE, C.; SIDDELL, S. G. Genomic RNA sequence of feline coronavirus strain FCoV C1Je. **J Feline Med Surg**, v. 9, n. 3, p. 202-213, 2007.
- FOLEY, J. E.; POLAND, A.; CARLSON, J.; PEDERSEN, N. C. Patterns of feline coronavirus infection and fecal shedding from cats in multiple-cat environments. **J Am Vet Med Assoc**, v. 210, n. 9, p. 1307-1312, 1997.
- FOLEY, J. E.; RAND, C.; LEUTENEGGER, C. Inflammation and changes in cytokine levels in neurological feline infectious peritonitis. **J Feline Med Surg**, v. 5, n. 6, p. 313-322, 2003.
- HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucl. Acids. Symp. Ser.**, v. 41, p. 95-98, 1999.
- HARDY, W. D., JR.; HURVITZ, A. I. Feline infectious peritonitis: experimental studies. **J Am Vet Med Assoc**, v. 158, n. 6, p. Suppl 2:994+, 1971.
- 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. **J Vet Intern Med**, v. 17, n. 6, p. 781-790, 2003.
- HARTMANN, K. Feline infectious peritonitis. **Vet Clin North Am Small Anim Pract**, v. 35, n. 1, p. 39-79, vi, 2005.
- HERREWEGH, A. A.; VENNEMA, H.; HORZINEK, M. C.; ROTTIER, P. J.; DE GROOT, R. J. The molecular genetics of feline coronaviruses: comparative sequence analysis of the ORF7a/7b transcription unit of different biotypes. **Virology**, v. 212, n. 2, p. 622-631, 1995a.
- HERREWEGH, A. A.; DE GROOT, R. J.; CEPICA, A.; EGBERINK, H. F.; HORZINEK, M. C.; ROTTIER, P. J. Detection of feline coronavirus RNA in feces, tissues, and body fluids of naturally infected cats by reverse transcriptase PCR. **J Clin Microbiol**, v. 33, n. 3, p. 684-689, 1995b.



HERREWEGH, A. A.; MAHLER, M.; HEDRICH, H. J.; HAAGMANS, B. L.; EGBERINK, H. F.; HORZINEK, M. C.; ROTTIER, P. J.; DE GROOT, R. J. Persistence and evolution of feline coronavirus in a closed cat-breeding colony. **Virology**, v. 234, n. 2, p. 349-363, 1997.

HERREWEGH, A. 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. **J Virol**, v. 72, n. 5, p. 4508-4514, 1998.

HOLST, B. S.; ENGLUND, L.; PALACIOS, S.; RENSTROM, L.; BERNDTSSON, L. T. Prevalence of antibodies against feline coronavirus and *Chlamydomydia felis* in Swedish cats. **J Feline Med Surg**, v. 8, n. 3, p. 207-211, 2006.

HORA, A. S.; ASANO, K. M.; GUERRA, J. M.; MESQUITA, R. G.; MAIORKA, P.; RICHTZENHAIN, L. J.; BRANDAO, P. E. Intrahost diversity of feline coronavirus: a consensus between the circulating virulent/avirulent strains and the internal mutation hypotheses? **ScientificWorldJournal**, v. 2013, p. 572325, 2013.

HORZINEK, M. C.; OSTERHAUS, A. D. Feline infectious peritonitis: a worldwide serosurvey. **Am J Vet Res**, v. 40, n. 10, p. 1487-1492, 1979.

HSIEH, L. E.; HUANG, W. P.; TANG, D. J.; WANG, Y. T.; CHEN, C. T.; CHUEH, L. L. 3C protein of feline coronavirus inhibits viral replication independently of the autophagy pathway. **Res Vet Sci**, v. 95, n. 3, p. 1241-1247, 2013.

KENNEDY, M.; BOEDEKER, N.; GIBBS, P.; KANIA, S. Deletions in the 7a ORF of feline coronavirus associated with an epidemic of feline infectious peritonitis. **Vet Microbiol**, v. 81, n. 3, p. 227-234, 2001.

KIPAR, A.; KREMENDAHL, J.; ADDIE, D. D.; LEUKERT, W.; GRANT, C. K.; REINACHER, M. Fatal enteritis associated with coronavirus infection in cats. **J Comp Pathol**, v. 119, n. 1, p. 1-14, 1998.

KIPAR, A.; MAY, H.; MENGER, S.; WEBER, M.; LEUKERT, W.; REINACHER, M. Morphologic features and development of granulomatous vasculitis in feline infectious peritonitis. **Vet Pathol**, v. 42, n. 3, p. 321-330, 2005.

KIPAR, A.; MELI, M. L.; BAPTISTE, K. E.; BOWKER, L. J.; LUTZ, H. Sites of feline coronavirus persistence in healthy cats. **J Gen Virol**, v. 91, pt. 7, p. 1698-1707, 2010.

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. **Clin Diagn Lab Immunol**, v. 12, n. 10, p. 1209-1215, 2005.

LAI, M. M. C.; HOLMES, K. Coronaviridae: the viruses and their replication. In: Knipe, D. V. e Howley, P. M. (Ed.). **Fields Virology**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. v.1, p.951-969.

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**, v. 19, n. 7, p. 1066-1073, 2013.

MOK, C. K.; CHANG, S. C.; CHEN, G. W.; LO, Y. L.; CHEN, S. J.; WU, H. S.; LIU, M. T.; CHANG, F. Y.; LIN, T. Y.; SHIH, S. R. Pyrosequencing reveals an oseltamivir-resistant marker in the quasispecies of avian influenza A (H7N9) virus. **J Microbiol Immunol Infect**, v., n., p., 2013.

NORRIS, J. M.; BOSWARD, K. L.; WHITE, J. D.; BARAL, R. M.; CATT, M. J.; MALIK, R. Clinicopathological findings associated with feline infectious peritonitis in Sydney, Australia: 42 cases (1990-2002). **Aust Vet J**, v. 83, n. 11, p. 666-673, 2005.

PALTRINIERI, S.; GRIECO, V.; COMAZZI, S.; CAMMARATA PARODI, M. Laboratory profiles in cats with different pathological and immunohistochemical findings due to feline infectious peritonitis (FIP). **J Feline Med Surg**, v. 3, n. 3, p. 149-159, 2001.

PEDERSEN, N. C.; BOYLE, J. F.; FLOYD, K.; FUDGE, A.; BARKER, J. An enteric coronavirus infection of cats and its relationship to feline infectious peritonitis. **Am J Vet Res**, v. 42, n. 3, p. 368-377, 1981.

PEDERSEN, N. C. An overview of feline enteric coronavirus and infectious peritonitis virus infections. **Feline Pract**, v. 23, n., p. 7-20, 1995a.

PEDERSEN, N. C. The history and interpretation of feline coronavirus serology. **Feline Pract**, v. 23, n., p. 46-51, 1995b.

PEDERSEN, N. C.; SATO, R.; FOLEY, J. E.; POLAND, A. M. Common virus infections in cats, before and after being placed in shelters, with emphasis on feline enteric coronavirus. **J Feline Med Surg**, v. 6, n. 2, p. 83-88, 2004.

PEDERSEN, N. C.; ALLEN, C. E.; LYONS, L. A. Pathogenesis of feline enteric coronavirus infection. **J Feline Med Surg**, v. 10, n. 6, p. 529-541, 2008.

PEDERSEN, N. C. A review of feline infectious peritonitis virus infection: 1963-2008. **J Feline Med Surg**, v. 11, n. 4, p. 225-258, 2009.

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.

PEDERSEN, N. C.; LIU, H.; SCARLETT, J.; LEUTENEGGER, C. M.; GOLOVKO, L.; KENNEDY, H.; KAMAL, F. M. 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**, v. 165, n. 1, p. 17-28, 2012.

PENTON, P. K.; BLACKARD, J. T. Analysis of HIV Quasispecies Suggests Compartmentalization in the Liver. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v., n., p., 2013.

PESTEANU-SOMOGYI, L. D.; RADZAI, C.; PRESSLER, B. M. Prevalence of feline infectious peritonitis in specific cat breeds. **J Feline Med Surg**, v. 8, n. 1, p. 1-5, 2006.

POLAND, A. M.; VENNEMA, H.; FOLEY, J. E.; PEDERSEN, N. C. Two related strains of feline infectious peritonitis virus isolated from immunocompromised cats infected with a feline enteric coronavirus. **J Clin Microbiol**, v. 34, n. 12, p. 3180-3184, 1996.

PRATELLI, A. Comparison of serologic techniques for the detection of antibodies against feline coronaviruses. **J Vet Diagn Invest**, v. 20, n. 1, p. 45-50, 2008.

QUAN, Y.; XU, H.; WAINBERG, M. A. Defective HIV-1 quasispecies in the form of multiply drug-resistant proviral DNA within cells can be rescued by superinfection with different subtype variants of HIV-1 and by HIV-2 and SIV. **J Antimicrob Chemother**, v. 69, n. 1, p. 21-27, 2014.

REGAN, A. D.; SHRAYBMAN, R.; COHEN, R. D.; WHITTAKER, G. R. Differential role for low pH and cathepsin-mediated cleavage of the viral spike protein during entry of serotype II feline coronaviruses. **Vet Microbiol**, v. 132, n. 3-4, p. 235-248, 2008.

ROTTIER, P. J. The coronavirus membrane glycoprotein. In: SIDDELL, S. G. (Ed.). **The Coronaviridae**. New York: Plenum Press, 1995, p.115-140.

ROTTIER, P. J.; 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. **J Virol**, v. 79, n. 22, p. 14122-14130, 2005.

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. **J Virol Methods**, v. 124, n. 1-2, p. 111-116, 2005.

SPARKES, A. H.; GRUFFYDD-JONES, T. J.; HARBOUR, D. A. Feline infectious peritonitis: a review of clinicopathological changes in 65 cases, and a critical assessment of their diagnostic value. **Vet Rec**, v. 129, n. 10, p. 209-212, 1991.

SPARKES, A. H.; GRUFFYDD-JONES, T. J.; HOWARD, P. E.; HARBOUR, D. A. Coronavirus serology in healthy pedigree cats. **Vet Rec**, v. 131, n. 2, p. 35-36, 1992.

SPARKES, A. H.; GRUFFYDD-JONES, T. J.; HARBOUR, D. A. Feline coronavirus antibodies in UK cats. **Vet Rec**, v. 131, n. 10, p. 223-224, 1992.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Mol Biol Evol**, v. 28, n. 10, p. 2731-2739, 2011.

TOPFER, A.; HOPER, D.; BLOME, S.; BEER, M.; BEERENWINKEL, N.; RUGGLI, N.; LEIFER, I. Sequencing approach to analyze the role of quasispecies for classical swine fever. **Virology**, v. 438, n. 1, p. 14-19, 2013.

TRULOVE, S. G.; MCCAHERN, H. A.; NICHOLS, R.; FOOSHEE, S. K. Pyogranulomatous pneumonia associated with generalized non-effusive feline infectious peritonitis. **Feline Pract**, v. 20, n., p. 25-29, 1992.

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.

VIGNUZZI, M.; STONE, J. K.; ARNOLD, J. J.; CAMERON, C. E.; ANDINO, R. Quasispecies diversity determines pathogenesis through cooperative interactions in a viral population. **Nature**, v. 439, n. 7074, p. 344-348, 2006.

VOGEL, L.; VAN DER LUBBEN, M.; TE LINTELO, E. G.; BEKKER, C. P.; GEERTS, T.; SCHUIJFF, L. S.; GRINWIS, G. C.; EGBERINK, H. F.; ROTTIER, P. J. Pathogenic characteristics of persistent feline enteric coronavirus infection in cats. **Vet Res**, v. 41, n. 5, p. 71, 2010.

YAM WC; CHAN KH; POON LLM; GUAN Y; YUEN KY; SETO WH. Evaluation of RT-PCR assays for rapid diagnosis of severe acute respiratory syndrome (SARS) associated with a novel coronavirus. **J Clin Microbiol**, v., n. 41, p. 4521-4524, 2003.

**APÊNDICE A** - Identificação e classificação dos felinos participantes do presente estudo.

<b>Nome</b>	<b>Idade (meses)</b>	<b>Sexo</b>	<b>Raça</b>	<b>PIF</b>
<b>Leide (USP 8)</b>	6	F	SRD	Efusiva
<b>Frederico (USP 9)</b>	4	M	Sagrado da Birmânia	Seca
<b>Coockie (USP 7)</b>	6	M	Siamês	Seca
<b>Tom (USP 11)</b>	3	M	SRD	Efusiva
<b>Pirilampo (USP 12)</b>	24	M	SRD	Efusiva
<b>Lineu (USP 5)</b>	4	M	SRD	Efusiva
<b>Mel (USP 4)</b>	7	F	Siamês	Efusiva
<b>Lara (USP 10)</b>	36	F	Maine coon	Efusiva
<b>Akita (USP 13)</b>	1	F	SRD	Efusiva
<b>Mile (USP 6)</b>	4	F	SRD	Seca
<b>Chiquinho</b>	144	M	Siamês	Seca
<b>Tutu</b>	1	F	SRD	Efusiva
<b>Milka</b>	9	F	Ragdoll	Seca
<b>Tom tom</b>	48	F	Siamês	Efusiva
<b>Arthur</b>	7	M	SRD	Efusiva
<b>Rebeca</b>	7	F	SRD	Efusiva
<b>Hope</b>	4	M	SRD	Efusiva
<b>Ágata</b>	24	F	SRD	Seca
<b>Beth (USP 1)</b>	168	F	SRD	NÃO
<b>Raji (USP 2)</b>	42	M	SRD	NÃO
<b>Sofia (USP 3)</b>	36	F	SRD	NÃO
<b>Cris (USP 14)</b>	2	M	SRD	NAO

Fonte: HORA, A.S. (2014).

Nota: F, fêmea; M, macho; SRD, sem raça definida.

**APÊNDICE B - Resultado da RT-PCR para o RNAm dos FCoV em diversas amostras biológicas de felinos eutanasiados devido às manifestações clínicas graves compatíveis com PIF.**

Amostra	Felinos																	
	Leide	Frederico	Cookie	Tom	Pirilampo	Lineu	Mel	Lara	Akita	Mile	Chiquinho	Tutu	Milka	Tom tom	Arthur	Rebeca	Hope	Ágata
Cerebro	neg	neg	neg	pos	pos	*	neg	neg	pos	pos	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	pos
Cerebelo	neg	neg	pos	neg	pos	*	*	neg	*	pos	neg	neg	neg	neg	pos	pos	*	*
Humor aquoso direito	neg	pos	neg	neg	neg	*	pos	neg	neg	pos	neg	neg	*	*	neg	neg	*	*
Humor aquoso esquerdo	neg	neg	neg	pos	pos	*	pos	neg	pos	pos	neg	neg	*	*	neg	neg	*	*
Linfonodo torácico	pos	neg	*	neg	*	pos	pos	*	neg	neg	neg	pos	*	*	neg	pos	*	*
Timo	pos	*	*	neg	*	*	*	*	*	pos	*	pos	*	*	neg	*	*	*
Pulmão	pos	neg	neg	neg	neg	pos	pos	neg	pos	pos	pos	neg	pos	neg	pos	pos	pos	neg
Coração	neg	neg	neg	neg	*	*	*	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	*
Efusão torácica	neg	neg	*	neg	pos	pos	pos	neg	pos	*	*	neg	*	pos	*	*	pos	*
Estômago	pos	neg	neg	neg	neg	*	*	neg	*	pos	neg	neg	*	neg	pos	pos	pos	*
Fígado	pos	neg	neg	neg	neg	pos	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	neg	neg
Baço	pos	neg	neg	neg	neg	pos	*	neg	neg	pos	pos	neg	neg	neg	pos	pos	neg	neg
Linfonodo mesentérico	pos	neg	neg	pos	*	pos	pos	pos	pos	pos	neg	neg	*	neg	pos	pos	pos	neg
IG	pos	pos	pos	pos	neg	pos	pos	neg	neg	neg	pos	neg	pos	neg	pos	pos	pos	neg
CIG	neg	pos	pos	neg	neg	pos	pos	pos	pos	pos	neg	neg	*	neg	neg	neg	*	neg
ID	pos	neg	neg	neg	neg	pos	neg	neg	neg	neg	pos	neg	*	neg	neg	neg	*	neg
CID	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	*	neg	pos	*	*	neg	neg	*	*
Rim direito	pos	neg	neg	neg	neg	pos	pos	neg	pos	pos	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	pos
Rim esquerdo	pos	neg	neg	neg	neg	pos	pos	neg	pos	pos	neg	neg	neg	neg	pos	pos	pos	pos
Efusão abdominal	pos	neg	*	pos	*	pos	pos	pos	*	*	*	pos	*	neg	*	**	*	*
Pâncreas	*	*	*	*	*	*	*	neg	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Bexiga	pos	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	neg	*	*	neg	pos	neg	*
Sangue	*	*	neg	*	*	*	neg	*	*	pos	*	*	*	*	*	*	*	*
Linfonodo periancreático	pos	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Globo ocular	*	*	*	*	*	*	pos	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Efusão pericárdica	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	pos	*	neg	neg	**	pos	*
Urina	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	neg	*	Pos	pos	pos	neg	*
Granuloma	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	pos	*	*	*	*	*
Linfonodo submandibular	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	pos	*
Total (%)	11/22 (50)	3/19 (15,79)	3/17 (17,65)	5/20 (25)	4/15 (26,67)	12/13 (92,31)	13/17 (76,47)	4/19 (21,05)	9/16 (56,25)	13/18 (72,22)	12/19 (63,16)	5/23 (21,74)	3/10 (30)	2/17 (11,76)	9/21 (42,86)	13/18 (72,22)	11/15 (73,33)	3/10 (30)

Fonte: Hora, A.S. (2014).

Nota: Pos, positivo; Neg, negativo; \*, amostra não coletada; \*\* não realizado; IG, intestino grosso; CIG, conteúdo do IG; ID, intestino delgado; CID, conteúdo do ID.

**APÊNDICE C** - Valores de médias, máximas e mínimas identidades de nucleotídeos observados nos clones deste estudo, referentes aos genes 3a-c.

Identificação	3a			3b			3c		
	Média (%)	Máx. (%)	Mín. (%)	Média (%)	Máx. (%)	Mín. (%)	Média (%)	Máx. (%)	Mín. (%)
<b>Raji/Fezes/PIF-/local1</b>	99,83	100,00	99,50	100,00	100,00	100,00	99,45	99,50	99,40
<b>Arthur/Cerebro/PIF+/local2</b>	99,25	100,00	98,50	97,92	100,00	94,50	99,33	100,00	98,50
<b>Arthur/IG/PIF+/local2</b>	99,50	100,00	99,00	99,03	99,50	98,60	99,50	99,50	99,50
<b>Rebeca/Cerebro/PIF+/local2/</b>	98,70	99,50	98,10	98,68	100,00	98,10	99,80	99,80	99,80
<b>Coockie/Cerebro/PIF+/local3</b>	99,02	100,00	98,10	96,39	100,00	88,10	99,79	100,00	99,70
<b>Coockie/Fezes/PIF+/local3</b>	99,42	100,00	97,10	92,16	100,00	83,30	97,29	100,00	95,50
<b>Cris/Fezes/PIF-/local4</b>	95,86	100,00	91,50	98,96	100,00	97,70	99,48	100,00	98,80
<b>Hope/Cerebro/PIF+/local5</b>	99,42	100,00	99,00	99,33	99,50	99,00	100,00	100,00	100,00
<b>Leide/Bexiga/PIF+/local6</b>	98,70	99,50	98,10	99,89	100,00	99,50	99,73	100,00	99,20
<b>Mile/Estomago/PIF+/local7</b>	99,67	100,00	99,50	100,00	100,00	100,00	99,92	100,00	99,80
<b>Mile/Fezes/PIF+/local7</b>	100,00	100,00	100,00	99,03	99,50	98,60	99,20	99,20	99,20
<b>Amostras fecais</b>	97,70	100,00	91,50	92,09	100,00	81,50	95,64	100,00	93,20
<b>Amostras teciduais</b>	99,38	100,00	98,10	90,09	100,00	75,60	95,37	100,00	92,70

Fonte: Hora, A.S. (2014).

**APÊNDICE D** - Valores de médias, máximas e mínimas identidades de nucleotídeos observados nos clones deste estudo, referentes aos genes 3a-c. \* apenas 1 clone do gene M foi obtido, portanto não foi possível a obtenção dos dados apresentados na tabela.

Identificação	E			M		
	Média (%)	Máx. (%)	Mín. (%)	Média (%)	Máx. (%)	Mín. (%)
<b>Raji/Fezes/PIF-/local1</b>	99,75	100,00	99,50	99,52	99,80	99,30
<b>Arthur/Cerebro/PIF+/local2</b>	99,67	100,00	99,50	99,18	99,60	98,70
<b>Arthur/IG/PIF+/local2</b>	99,67	100,00	99,50	*	*	*
<b>Coockie/Cerebro/PIF+/local3</b>	99,53	100,00	99,10	99,48	100,00	99,40
<b>Coockie/Fezes/PIF+/local3</b>	100,00	100,00	100,00	99,54	100,00	99,10
<b>Hope/Cerebro/PIF+/local5</b>	99,83	100,00	99,50	99,70	100,00	99,40
<b>Mile/Estomago/PIF+/local7</b>	99,90	100,00	99,50	99,77	99,80	99,70
<b>Rebeca/Cerebro/PIF+/local2/</b>	100,00	100,00	100,00	99,53	99,60	99,40
<b>Amostras fecais</b>	93,87	100,00	91,10	92,89	100,00	89,60
<b>Amostras teciduais</b>	95,19	100,00	89,90	93,89	100,00	89,80

Fonte: Hora, A.S. (2014).