

DETECÇÃO POR TÉCNICA MOLECULAR DE CORONAVÍRUS CANINO EM CÃES NO MUNICÍPIO DE PELOTAS, RIO GRANDE DO SUL

WELLINGTON DA ROCHA DA SILVA¹; WINNIE DE OLIVEIRA DOS SANTOS²;
ANA CAROLINA DE ASSIS SCARIOT³; RENATA NOBRE DA FONSECA⁴;
JULIANA MONTIEL NUNEZ⁵; SILVIA DE OLIVEIRA HÜBNER⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – wellingtondasilva.ws@gmail.com

^{2,3,4,5} Universidade Federal de Pelotas – winnie-oliveira@hotmail.com²; carolinascariot@live.com³;
renatanobredafonseca@gmail.com⁴; julianamontielnunez@gmail.com⁵

⁶Universidade Federal de Pelotas – silviaohubner@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O coronavírus canino (CCoV) pertence à família *Coronaviridae*, gênero *Alphacoronavirus*, espécie *Alphacoronavirus 1* (ICTV, 2023). O genoma é constituído por uma fita simples de RNA, sentido positivo. Sua estrutura é composta de um envelope envolvendo o capsídeo viral, onde estão inseridas a glicoproteína *Spike* (S), a qual confere uma aparência de coroa (HAAKE et al, 2020). Genotipicamente, está classificado em CCoV tipo I (CCoV-I) e CCoV tipo II (CCoV-II), conforme modificações na proteína S (DONG et al, 2022).

O CCoV possui a capacidade de infectar cães de diferentes idades, sexo e raças (DONG et al, 2022), causando geralmente uma diarreia de moderada a severa (VLASOVA et al, 2021). HAAKE et al (2020) relata manifestações clínicas como enterite hemorrágica, enterite necrótica e intussuscepção ileocecal. Segundo CERRACCHIO et al (2022), a infecção possui alta morbidade e baixa letalidade. Contudo, a letalidade costuma ser alta em coinfeções com parvovírus e/ou quando acomete filhotes (DONG et al, 2022). A rota fecal-oral configura a principal via de transmissão (DECARO, BUONAVOGLIA, 2011).

O diagnóstico da infecção por CCoV torna-se de suma importância como diferencial de outras patologias, como parvovirose, cinomose e rotavírus (Vieira 2015). A técnica de RT-PCR (*reverse transcription - polymerase chain reaction*) apresenta alta sensibilidade e especificidade para diagnóstico de infecção por CCoV (PRATELLI et al, 2000).

Tendo em vista a importância clínica do CCoV em Medicina Veterinária, o trabalho teve por objetivo identificar a presença do vírus em amostras clínicas de cães do município de Pelotas. Foi eleita, como método de detecção, a técnica de RT-PCR.

2. METODOLOGIA

As amostras provieram de seis clínicas veterinárias distribuídas no município de Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil. As coletas foram realizadas no período que compreende entre março de 2021 e janeiro de 2022. Ao total, obteve-se 58 amostras, destas, 53 foram *swabs* retais e 5 de órgãos (intestino delgado e grosso), referentes a 53 animais. O critério para coleta foi a presença de sinais gastrointestinais (anorexia, diarreia, vômito) ou idade dos pacientes (cães jovens).

Os *swabs* foram transportados em solução comercial *RNAlater Stabilization Solution* (*Thermo Fischer Scientific*) e armazenados em freezer -80° C. Os órgãos,

após serem retirados no Laboratório de Patologia da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), foram armazenados também a -80°C .

A extração de ácidos nucleicos totais e purificação foram realizadas com kit de extração *Bio Gene Extração de DNA/RNA Viral*, de acordo com as especificações do fabricante. A obtenção do cDNA (DNA complementar) a partir do RNA extraído, deu-se através do kit comercial *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit da Applied Biosystems™*, de acordo com as especificações do fabricante.

Para detecção, foi realizada uma nested-PCR descrita por PRATELLI et al (2000), com alterações. O alvo da reação é a região do RNA codificante da proteína M de membrana. Os *primers* utilizados no primeiro round foram o CCV1 e CCV2 (Figura 1), num volume de 1 microlitro cada (10 picomol). Além dos primers, adicionou-se 12,5 microlitros 1x GoTaq® Colorless Master Mix, 7,5 microlitros de água DNase free e 3 microlitros do cDNA obtido, totalizando um volume de 25 microlitros na reação. As condições de termociclagem foram: 95°C por 7 minutos; 35 ciclos de 94°C (1 minuto), 55°C (1 minuto), 72°C (1 minuto); e 72° por 7 minutos. No segundo *round*, foram utilizados os *primers* CCV2 e CCV3, com 3 microlitros obtidos do primeiro *round*, submetendo-se às mesmas condições de termociclagem anterior.

Os produtos obtidos no segundo round foram submetidos a uma eletroforese em gel de agarose a 2%, numa cuba contendo TBE 0,5 X, a um diferencial de potencial elétrico de 80 V por 1 hora. Empregou-se o brometo de etídio como intercalante de DNA. A leitura foi realizada em um transiluminador, sendo que bandas com um tamanho de 230 pb significavam um resultado positivo para CCoV.

Tabela 1. Primers iniciadores utilizados na semi-nested RT-PCR para a detecção de coronavírus canino descritos por PRATELLI et al. (2000).

<i>Primers</i>	Orientação	Sequência (5'-3')	Posição	Tamanho do Amplicon
CCV1	Senso	TCCAGATATGTAATGTTCGG	337–356	409bp
CCV2	Anti-senso	TCTGTTGAGTAATCACCAGCT	726–746	
CCV3	Senso	GGTGTCCTCTAACATTGCTT	535–556	230 bp

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO



Figura 1: Eletroforese de produtos de RT-PCR para detecção de CCoV. Vê-se o marcador (1), controle positivo (2), amostras (3,4,5,6,7), controle negativo (8)

Fonte: Arquivo pessoal.

Das 58 amostras, 7 foram positivas (apresentaram banda característica como observado na Figura 1) para a presença de RNA de CCoV. Destas, 6 eram swabs retais e 1 de intestino grosso. Todas representavam animais diferentes, ou seja, 7 positivos num total de 53 (13,2%). Os animais com resultados positivos tinham idades entre 3 meses e 4 anos. Os dados sobre os animais estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Dados clínicos dos animais onde foi possível detectar CCoV.

Idade	Sexo	Sinais clínicos
3 meses	Macho	Vômito, diarreia e desconforto abdominal
6 meses	Fêmea	Anorexia, diarreia e desconforto abdominal
3 meses	Macho	Diarreia, anorexia, vômito e desconforto abdominal
3 meses	Macho	Vômito, diarreia e desconforto abdominal
3 meses	Macho	Vômito, diarreia, anorexia e desconforto abdominal
1 ano	Macho	Diarreia
4 anos	Fêmea	Vômito

A literatura reporta que o CCoV apresenta distribuição global (HAAKE et al, 2022), sendo evidenciado pela presença de CCoV nas amostras coletadas em Pelotas. Além disso, COSTA (2013) realizou um estudo no Estado do Rio de Janeiro entre os anos 2005 e 2012, revelando uma prevalência de aproximadamente 15 %, algo próximo do presente estudo (13,2%). Importante salientar que o critério de amostragem utilizado por COSTA (2013) foi semelhante do presente trabalho (animais com sintomatologia gastrointestinal).

Ainda que contemplados animais não sintomáticos (n=9), foi possível observar que todas as amostras positivas provieram de cães com manifestações clínicas gastrointestinais. Como o CCoV pode desenvolver uma infecção assintomática (DEZENGRINI; WEIBLEN; FLORES, 2007), surge a possibilidade de mudar os critérios de amostragem, incluindo um número maior de animais assintomáticos.

Segundo PRATELLI (2006), todos os cães são suscetíveis, independente da idade. No presente estudo, embora tenha sido detectado na maioria em animais jovens, houve 1 animal com idade de 4 anos (apresentava diarreia).

4. CONCLUSÕES

Através de RT-PCR foi possível detectar a presença de CCoV em cães no município de Pelotas. O trabalho demonstra a circulação do vírus no município de Pelotas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFANO, F. et al. (2019). Identification of pantropic canine coronavirus in a wolf (*Canis lupus italicus*) in Italy. *Journal of Wildlife Diseases*, 55(2), 504–508.

CERRACCHIO, C.. Canine Coronavirus Activates Aryl Hydrocarbon Receptor during In Vitro Infection. *Viruses*, [S.L.], v. 14, n. 11, p. 2437, 3 nov. 2022. MDPI AG.

COSTA, E.M. **Caracterização molecular dos genes “M” e “S” dos coronavírus associados à gastroenterite em cães no Estado do Rio de Janeiro.** 2013. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-Graduação em Microbiologia e Parasitologia Aplicadas, Universidade Federal Fluminense.

DECARO, N.; BUONAVOGLIA, C.. Canine Coronavirus: not only an enteric pathogen. **Veterinary Clinics Of North America: Small Animal Practice**, [S.L.], v. 41, n. 6, p. 1121-1132, nov. 2011.

DEZENGRINI, R.; WEIBLEN, R; FLORES, E.F. Soroprevalência das infecções por parvovírus, adenovírus, coronavírus canino e pelo vírus da cinomose em cães de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, [S.L.], v. 37, n. 1, p. 183-189, fev. 2007.

DONG, B. et al. Epidemiological investigation of canine coronavirus infection in Chinese domestic dogs: a systematic review and data synthesis. **Preventive Veterinary Medicine**, [S.L.], v. 209, p. 105792, dez. 2022. Elsevier BV.

HAAKE, C. et al. Coronavirus Infections in Companion Animals: virology, epidemiology, clinical and pathologic features. **Viruses**, [S.L.], v. 12, n. 9, p. 1023, 13 set. 2020. MDPI AG.

ICTV. **Genus: Alphacoronavirus.** Acessado em: 23 ago. 2023. Disponível em: <https://ictv.global/report/chapter/coronaviridae/coronaviridae/alphacoronavirus>.

PRATELLI, A. Genetic evolution of canine coronavirus and recent advances in prophylaxis. **Veterinary Research**, [S.L.], v. 37, n. 2, p. 191-200, mar. 2006. EDP Sciences.

PRATELLI, A. Diagnosis of canine coronavirus infection using nested-PCR. **Journal Of Virological Methods**, [S.L.], v. 84, n. 1, p. 91-94, jan. 2000.

VIEIRA, F. V. **Coronavírus canino (CCoV): isolamento e detecção molecular em amostras clínicas.** 2015. Dissertação (Mestrado) - Curso Pós-graduação em Ciência Animal, Universidade Estadual Paulista.

VLASOVA, A.N. et al. Novel Canine Coronavirus Isolated from a Hospitalized Patient With Pneumonia in East Malaysia. **Clinical Infectious Diseases**, [S.L.], v. 74, n. 3, p. 446-454, 20 maio 2021. Oxford University Press (OUP).