

ANÁLISE FILOGENÉTICA DE CORONAVÍRUS FELINO EM AMOSTRAS PROVENIENTES DE GATOS NO MUNICÍPIO DE PELOTAS

WELLINGTON DA ROCHA DA SILVA¹; ANA CAROLINA SCARIOT²; RENATA MARQUES PIEROBOM GRESSLER³; FLÁVIA BARTZ NUNES⁴; JULIANA MONTIEL NUNEZ⁵; SILVIA DE OLIVEIRA HÜBNER⁶

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

²Universidade Federal de Pelotas – carolinascariot@live.com

³Universidade Federal de Pelotas – repirobomgressler@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – flaviabartznunes8@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – julianamontielnunez@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – silviaoliveirahubner@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O coronavírus felino (FCoV) pertence à família *Coronaviridae*, espécie *Alphacoronavirus 1* (ICTV, 2023). O genoma é constituído por uma fita simples de RNA em sentido positivo. Possui um capsídeo envolto por envelope, o qual apresenta a proteína *spike* (S), responsável pela ligação do vírus aos receptores celulares do hospedeiro (CHOU, 2024). Há a presença de dois sorotipos, o sorotipo I (FCoV-I), mais prevalente na população mundial de gatos, e o sorotipo II (FCoV-II), menos prevalente (BROSTOFF et al, 2024).

A infecção por FCoV é muito comum em gatos, sendo a via fecal-oral a principal forma de transmissão. De acordo com a patogenicidade, o FCoV é classificado em dois biotipos: coronavírus entérico felino (FECV) e vírus da peritonite infecciosa felina (FIPV) (DONG et al, 2024). O FECV leva ao surgimento de uma enterite, podendo cursar com diarreia. Podem ocorrer mutações durante o processo de replicação do FECV, acarretando no surgimento do FIPV e o consequente desenvolvimento da peritonite infecciosa felina (PIF). A PIF é extremamente letal (POPOVICI et al, 2024).

Dentre as mutações suspeitas de estarem envolvidas na transformação de FECV para FIPV, e consequente alteração de patogenicidade, são descritas mutações na proteína *spike* (S) (DECARO et al, 2021). Dessa forma, o sequenciamento do gene S (que codifica a proteína S) pode fornecer informações sobre a presença de possíveis mutações que possam estar associadas ao surgimento do FIPV, além de possibilitar a caracterização da diversidade genética do FCoV.

O presente trabalho teve por objetivo obter sequências do gene S de amostras de FCoV provenientes de gatos do município de Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil e estabelecer uma análise filogenética.

2. METODOLOGIA

Foram obtidas amostras de 77 gatos provenientes de clínicas e hospitais veterinários do município de Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil, entre novembro de 2020 e dezembro de 2021. As amostras foram compostas de *swabs* retais (animais saudáveis, com sintomatologia entérica ou PIF); sangue total; efusão pleural e abdominal, bem como órgãos (fígado, baço, intestino, linfonodos mesentéricos, omento e rins) de animais com sintomatologia de PIF. Após coleta,

os *swabs* foram imersos em solução com RNAlater™ Stabilization Solution (Invitrogen™, EUA). Todo o material foi armazenado em freezer -80 °C até o processamento no Laboratório de Virologia e Imunologia da Universidade Federal de Pelotas.

O RNA foi extraído com o kit comercial BioGene extração de DNA/RNA viral (Bioclin/Quibasa – Química Básica Ltda., MG, Brasil) de acordo com as instruções contidas no protocolo do fabricante. O cDNA para realização da posterior RT-PCR (reação em cadeia da polimerase por transcrição reversa), foi obtido utilizando-se o kit comercial High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Applied Biosystems™, MA, EUA), de acordo com as informações do fabricante.

Como etapa de triagem, realizou-se uma *semi-nested* RT-PCR descrita por PRATELLI et al (2000), com adaptações, para identificar a presença do vírus. Para execução da reação de PCR, utilizou-se o kit comercial GoTaq® Colorless Master Mix (Fitchburg, WI, EUA). Os *primers* usados possuem como alvo a região M (que codifica a proteína M), gerando *amplicons* de tamanhos descritos na Tabela 1. Ao final da reação, os produtos foram submetidos a uma eletroforese em gel de agarose para a identificação da presença do *amplicon* esperado.

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

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

Amostras positivas na etapa de triagem foram submetidas a uma RT-PCR, para amplificação do gene S (Tabela 2), conforme descrita por DECARO et al (2021), com modificações. Na reação, foi empregado o kit comercial GoTaq® Colorless Master Mix (Fitchburg, WI, EUA).

Tabela 2. *Primers* utilizados na RT-PCR para a região *spike* do FCoV (descritos por DECARO et al., 2021)

| <i>Primers</i> | Orientação | Sequência (5'-3') | Posição | <i>Amplicon</i> |
|----------------|------------|------------------------|-------------|-----------------|
| UCD5F | Senso | GCCCAATATTACAATGGCATAA | 26440-26461 | 215bp |
| UCD324 8R | Anti-Senso | AAGGCATTAGCAAGTATTTTC | 23637-23657 | |
| G2F | Senso | TAGGTGCACTTGGTGGTGGT | 23247-23265 | 250bp |
| G2R | Anti-Senso | GCATTTGCAAGTGAAAACAA | 23777-23496 | |

Alguns produtos da RT-PCR foram purificados com o kit Promega® Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo Kit (Promega Corporation, WI, EUA) e enviados à empresa ACTGene Análises Moleculares para sequenciamento pelo método Sanger.

A análise dos dados gerados no sequenciamento foi realizada no *software* Geneious versão 9.1.8 (Biomatters) e, para construção da árvore filogenética, as

Oito amostras positivas para FCV foram selecionadas para sequenciamento. Destas, 5 eram de gatos com sintomas entéricos, e portanto associados ao biotipo FECV (gatos identificados como 3, 4, 6, 7 e 8) e 3 eram de gatos com FIPV (gatos 1, 2 e 5). A árvore filogenética (Figura 1) foi obtida a partir de uma sequência de 189 nucleotídeos da região S.

Observou-se um alto grau de homologia entre as amostras do gato 1 e 5 com a sequência MW316841, encontrada na China. As sequências dos demais gatos mostraram uma homologia elevada com a sequência MH817484, a primeira sequência completa de FCoV no Brasil (DE BARROS et al, 2019). Importante destacar que não houve a formação de um grupo monofilético de FIPV em comparação às amostras de FECV, em consonância com os dados obtidos por DECARO et al (2021).

4. CONCLUSÕES

Através do sequenciamento das amostras foi possível evidenciar a ocorrência de uma diversidade genética das amostras de FCoV obtidas no trabalho. A árvore filogenética não permitiu distinguir sobre os biotipos (FIPV e FECV) de acordo com a sequência de nucleotídeos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BROSTOFF, T. et al. Feline Infectious Peritonitis mRNA Vaccine Elicits Both Humoral and Cellular Immune Responses in Mice. **Vaccines**, v. 12, n. 7, p. 705, 24 jun. 2024.

CHOU, A.-A. et al. Antiviral activity of *Vigna radiata* extract against feline coronavirus *in vitro*. **Veterinary Quarterly**, v. 44, n. 1, p. 1–13, 2024.

DE BARROS, B. D. C. V. et al. First Complete Genome Sequence of a Feline Alphacoronavirus 1 Strain from Brazil. **Microbiology Resource Announcements**, v. 8, n. 10, p. e01535-18, 7 mar. 2019.

DECARO, N. et al. Mutation analysis of the spike protein in Italian feline infectious peritonitis virus and feline enteric coronavirus sequences. **Research in Veterinary Science**, v. 135, p. 15–19, mar. 2021.

DONG, B. et al. Prevalence of natural feline coronavirus infection in domestic cats in Fujian, China. **Virology Journal**, v. 21, n. 1, p. 2, 3 jan. 2024.

ICTV. **Family: Coronaviridae**. 2023. Acesso em: 07 set. 2024. Disponível em: <https://ictv.global/report/chapter/coronaviridae/coronaviridae>

POPOVICI, I. et al. Phylogenetic Analysis of Alphacoronaviruses Based on 3c and M Gene Sequences Isolated from Cats with FIP in Romania. **Microorganisms**, v. 12, n. 8, p. 1557, 30 jul. 2024.

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