

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

WELLINGTON DA ROCHA DA SILVA<sup>1</sup>; ANA CAROLINA SCARIOT<sup>2</sup>; RENATA MARQUES PIEROBOM GRESSLER<sup>3</sup>; FLÁVIA BARTZ NUNES<sup>4</sup>; JULIANA MONTIEL NUNEZ<sup>5</sup>; SILVIA DE OLIVEIRA HÜBNER<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – [wellingtondasilva.ws@gmail.com](mailto:wellingtondasilva.ws@gmail.com)

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – [carolinascariot@live.com](mailto:carolinascariot@live.com)

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – [repirobomgressler@gmail.com](mailto:repirobomgressler@gmail.com)

<sup>4</sup>Universidade Federal de Pelotas – [flaviabartznunes8@gmail.com](mailto:flaviabartznunes8@gmail.com)

<sup>5</sup>Universidade Federal de Pelotas – [julianamontielnunez@gmail.com](mailto:julianamontielnunez@gmail.com)

<sup>6</sup>Universidade Federal de Pelotas – [silviaoliveirahubner@gmail.com](mailto: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	TCCAGATATGTAATGTTCGG	337–356	409bp
CCV2	Anti-senso	TCTGTTGAGTAATCACCAGCT	726–746	
CCV3	Senso	GGTGCTACTCTAACATTGCTT	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

amostras foram comparadas com as seguintes sequências depositadas no GenBank: MW225957-MW225998, FIV-I-Black, EU186072, FIPV-I-C1J, DQ848678, FCoV-I-RM, FJ938051, FCoV-I-UU54, JN183883, FCoV-I-UU7, FJ938053, FIPV-II-DF-2, JQ408981, MW316841 e MH817484.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

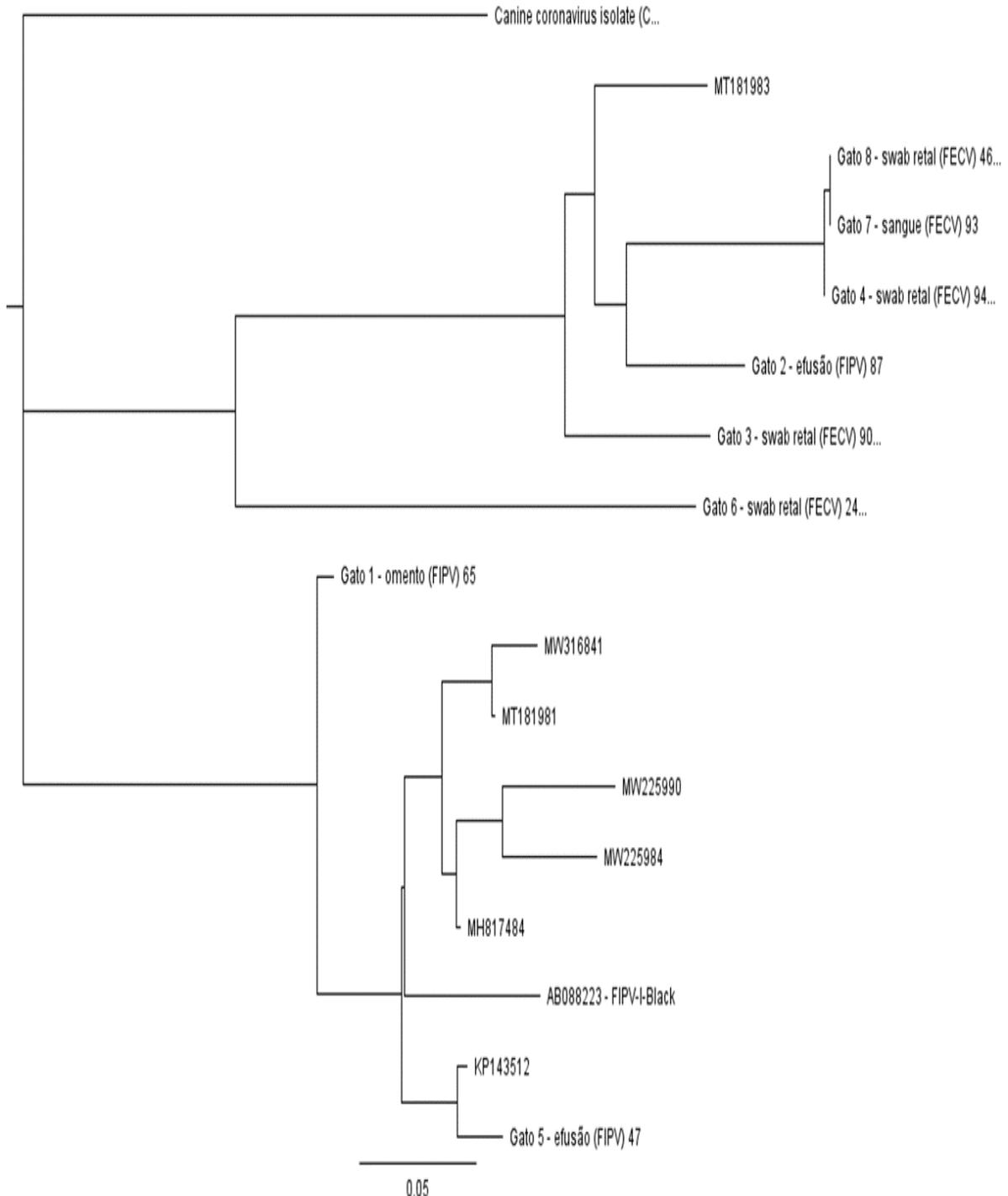


Figura 1. Árvore filogenética com base no gene S do FCoV (189 nucleotídeos) das amostras (gato 1, gato 2, gato 3, gato 4, gato 5, gato 6, gato 7 e gato 8) do estudo em comparação com as amostras de referência do GenBank (MW316841 e MH817484, MW225957, MW225998, FIV-I-Black, EU186072, FJ938053, JQ408981, DQ010921, GQ152141 e JN634064). A barra de escala representa o número estimado de substituições de nucleotídeos por 1000 bases.

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.