

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 13/01/2019.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

DESENVOLVIMENTO DO ELISA INDIRETO COM USO DE
PROTEÍNA RECOMBINANTE E ESTUDO SOROEPIDEMIOLÓGICO
PARA INFECÇÃO PELO CORONAVÍRUS FELINO (FCoV)

ARIANI CRISTINA DA SILVA ALMEIDA

BOTUCATU, SP.
JANEIRO, 2017.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

DESENVOLVIMENTO DO ELISA INDIRETO COM USO DE
PROTEÍNA RECOMBINANTE E ESTUDO SOROEPIDEMIOLÓGICO
PARA INFECÇÃO PELO CORONAVÍRUS FELINO (FCoV)

ARIANI CRISTINA DA SILVA ALMEIDA

Tese apresentada junto ao Programa de Pós-
Graduação em Medicina Veterinária para
obtenção do título de Doutora.

Orientador: Prof. Dr. João Pessoa Araújo Jr.

BOTUCATU, SP.
JANEIRO, 2017.

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Almeida, Ariani Cristina da Silva.

Desenvolvimento do Elisa Indireto com uso de proteína recombinante e estudo soroepidemiológico para infecção pelo Coronavírus felino (FCoV) / Ariani Cristina da Silva Almeida. - Botucatu, 2017

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: João Pessoa Araújo Junior

Capes: 50502034

1. Felídeo - Doenças. 2. Ensaio de imunoadsorção enzimática. 3. Coronavírus. 4. Infecções por coronavírus - Fatores de risco. 5. Estudos Soroepidemiológicos.

Palavras-chave: Coronavírus; ELISA; FCoV; Fatores de risco; Soroepidemiológico.

Nome do autor: Ariani Cristina da Silva Almeida.

Título: Desenvolvimento do ELISA indireto com uso de proteína recombinante e estudo soroepidemiológico para infecção pelo Coronavírus felino (FCoV).

Comissão Examinadora

Prof. Dr. João Pessoa Araújo Junior
Presidente e Orientador
Departamento de Microbiologia e Imunologia
IBTEC – IBB – UNESP – BOTUCATU

Dr^a Taís Fukuta da Cruz
Membro
Departamento de Microbiologia e Imunologia
IBTEC – IBB – UNESP – BOTUCATU

Prof^a Dr^a Luciane Alarcão Dias Melicio
Membro
Departamento de Patologia
FMB – UNESP – BOTUCATU

Prof. Dr. Angelo José Magro
Membro
Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia
FCA – UNESP – BOTUCATU

Prof. Dr. Marcelo de Souza Zanutto
Membro
Departamento de Clínica Veterinária
UEL – LONDRINA

Data da defesa: 13 de Janeiro de 2017.

“Logo, já não sou eu quem vive, mas Cristo vive mim; e esse viver que agora tenho na carne, vivo pela fé no Filho de Deus, que me amou e a si mesmo se entregou por mim”.

Galátas 2.20

Dedico este trabalho ao meu amado Senhor e Salvador Jesus, a Ele toda honra e toda glória para todo o sempre!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que com sua infinita bondade e misericórdia tem me abençoado, me fortalecido e me dado graça para viver, lutar e correr atrás dos meus sonhos. A Ti meu Pai toda a minha gratidão.

Ao meu Pai, Mãe e Avó por estarem sempre ao meu lado, me ajudando, me fortalecendo e não medindo esforços para fazer tudo por mim.

Ao meu amado marido Fábio, meu melhor amigo e companheiro, que esteve comigo nos momentos fáceis e difíceis, sempre me ajudando, me fortalecendo e me aproximando a cada dia mais do amor do Senhor Jesus.

Às minhas irmãs e cunhados Aline, Izidoro, Alessa e André, e meu amado sobrinho Vinícius por tudo que sempre fizeram por mim.

Ao meu orientador Prof. Dr. João Pessoa, por todos os conhecimentos ensinados e divididos, pelas oportunidades, paciência e confiança no meu trabalho.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de doutorado (processo 2014/02994-6).

As minhas amigas Doutoradas Selene e Vitória, pela amizade, colaboração e ajuda para colher as amostras do projeto. Quero que saibam que admiro muito as Médicas Veterinárias que vocês são, o amor com que trabalham ajudando os animais.

As minhas amigas e amigos de laboratório Cláudia Filone, Jacqueline, Sonia, Taís, Camila, Marina, Pamela, Duroc, Mariana, Cleiton e Agnes, que são pessoas que muito me ensinaram e contribuíram para o meu crescimento profissional e pessoal.

Ao professor Marcos Fontes e seu aluno Carlos Alexandre, que não mediram esforços para me ajudar e contribuir com o trabalho.

A Secretaria de Saúde da prefeitura de Botucatu, Setor de Educação e Comunicação em Saúde (SEDUCS), pela colaboração com o projeto, autorizando a colheita das amostras no Canil Municipal.

Aos meus irmãos em Cristo da família Presbiteriana Renovada de Botucatu, por todas as orações, amizade e força que sempre me deram.

As minhas companheiras felinas Fraila e Mika, pela amizade fiel.

Obrigada e que Deus abençoe a vida de todos!

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Primers utilizados na amplificação do fragmento que codifica a proteína N do FCoV.....	29
Tabela 2.	Primers utilizados para o sequenciamento.....	32
Tabela 3.	Testes de concentração de antígeno e diluição de soros.....	51
Tabela 4.	Teste de interferência da GST.....	52
Tabela 5.	Tabela de contingência de 151 amostras de soros de gatos testadas pelo ELISA indireto padronizado e pelo kit comercial ImmunoComb FCoV (FIP) (teste de referência).....	52
Tabela 6.	Frequência dos fatores de risco do estudo idade (faixa etária), raça, gênero, condição reprodutiva, acesso à rua e modo de criação (viver em grupo ou solitário).....	54
Tabela 7.	Significância estatística (p-valor) para cada variável.....	54
Tabela 8.	Regressão logística (p-valor) com as variáveis significativas analisadas em conjunto.....	55
Tabela 9.	Significância estatística da diferença entre diversas categorias das variáveis faixa etária, condição reprodutiva e acesso à rua.....	55
Tabela 10.	Estimativas e intervalos de confiança (95%) para a razão das chances..	56

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Desenho esquemático da estrutura do Coronavírus felino (FCoV). Proteínas estruturais: envelope (E), membrana (M), nucleocapsídeo (N), espícula (S). Fonte: KIPAR e MELI, 2014.....	19
Figura 2.	Esquema representativo das relações genéticas entre o FCoV e CCoV. As sequências azuis são de origem felina e as sequências laranja são de origem canina. As setas indicam os possíveis sítios de recombinações. FCoV-I: coronavírus felino sorotipo I. FCoV-II: coronavírus felino sorotipo II. CCoV-I: coronavírus canino sorotipo I. Pol: polimerase; Proteínas estruturais S (espícula), E (envelope), M (membrana) e N (nucleocapsídeo); Proteínas não estruturais 3a,b,c; 7a,b. Fonte: Le Poder, 2011 (modificada).....	21
Figura 3.	Mapa do vetor de expressão pGS21a. Na ponta da seta o local de inserção da sequência codificante da proteína N do FCoV entre os sítios de clonagem NcoI e BamHI. Fonte: GenScript – Modificado....	
Figura 4.	Gel de agarose a 1% após RT-PCR. Presença de fragmento de aproximadamente 1413 pb.....	41
Figura 5.	SDS-PAGE após purificação na coluna His Trap™ HP (GE Healthcare Life Science) com eluição de 500 mmol/L de Imidazol. M: marcador (Standards/Broad Range – Bio Rad®). Presença do fragmento esperado de aproximadamente 72 kDa nas alíquotas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9.....	43
Figura 6.	SDS-PAGE após purificação na coluna His Trap™ HP (GE Healthcare Life Science) com eluição de 500 mmol/L de Imidazol. M: marcador (Standards/Broad Range – Bio Rad®). Presença do fragmento esperado de aproximadamente 72 kDa nas alíquotas 10, 11, 12, 13, 14 e 15.....	43
Figura 7.	SDS-PAGE após reação enzimática com EK. M: marcador (Standards/Broad Range – Bio Rad). EK em diferentes concentrações - 2: 1 u; 3: 0,1 u; 4: 0,01 u; 5: 0,001 u; 6: 0,0001 u; 7: 0,00001 u; 8: 0,000001 u; 9: 0 u.....	44

- Figura 8.** SDS-PAGE após reação enzimática com EK. M: marcador (Standards/Broad Range – Bio Rad). EK em diferentes concentrações - 1: 1 u; 2: 0,1 u; 3: 0,01 u; 4: 0,001 u. Poço 2 com as frações esperadas de 72, 42 e 29 kDa..... 45
- Figura 9.** SDS-PAGE do teste de temperatura para a reação com a EK. M: marcador (Precision Plus Protein™ Standards, Bio Rad). Presença dos fragmentos de 72, 42 e 29 kDa nas temperaturas de 18°C, 20°C, 22°C, 24°C e 28°C..... 45
- Figura 10.** Western Blotting com uso de anticorpos anti-FCoV. M: marcador (Precision Plus Protein™ Standards, Bio Rad). Marcação evidente da fração de aproximadamente 42 kDa correspondente ao tamanho esperado da proteína N. Marcação de frações inespecíficas da bactéria menores que 20 kDa..... 46
- Figura 11.** Western Blotting com uso de anticorpo sintético anti-GST. M: marcador (Precision Plus Protein™ Standards, Bio Rad). Marcação evidente da fração de aproximadamente 29 kDa correspondente ao tamanho esperado da GST..... 47
- Figura 12.** Dot Blotting com uso do antígeno total (proteína N + GST clivadas) nas tiras A, B, C, D e E. Tiras A e B: marcação forte na fita - Uso de soros positivos para FCoV testados pelo kit ImmunoComb FCoV (FIP); Tiras C e D: marcação fraca na fita - Uso de soros negativos para FCoV testados pelo kit ImmunoComb FCoV (FIP); Tira E: marcação forte na fita – Uso de anticorpo sintético anti-GST. Uso do antígeno fração de GST purificada nas tiras F, G, H e I. Tiras F e G: marcação fraca na fita – Uso de soro positivo e negativo para FCoV testados pelo kit ImmunoComb FCoV (FIP); Tira H e I: marcação forte na fita – Uso de anticorpo sintético anti-GST..... 48
- Figura 13.** SDS-PAGE após purificação com a coluna HisTrap™ HP - M: marcador. Amostra 1: Proteína não passada pela coluna, mostrando as frações de 72, 42 e 29 kDa. Amostra 2: Fluxo de passagem no momento da aplicação da amostra total. Amostra 3: Lavagem da coluna pós-aplicação da amostra total. Amostra 4: Conteúdo da eluição, mostrando as frações de 72, 42 e 29 kDa..... 49

- Figura 14.** SDS-PAGE após purificação com a coluna GStap HP para separação das proteínas pós-reação com a EK. M: marcador (Precision Plus Protein™ Standards, Bio Rad). Alíquotas 1 a 8: fluxo de passagem no momento da aplicação da amostra total. Presença das frações de 72 kDa (fraca), 42 kDa e 29 kDa. Alíquota 9: lavagem da coluna após aplicação da amostra total. Presença da fração de 29 kDa..... 49
- Figura 15.** SDS-PAGE após purificação com a coluna GStap HP para separação das proteínas pós-reação com a EK. M: marcador (Precision Plus Protein™ Standards, Bio Rad). Alíquotas 10 a 13: lavagem da coluna após aplicação da amostra total. Presença da fração de 29 kDa. Alíquotas 14 a 18: etapa de eluição. Presença da fração de 29 kDa..... 50
- Figura 16.** SDS-PAGE após gel filtração, com a coluna Superdex™ 75 10/300 GL, para separação das proteínas pós-reação com a EK. M: marcador (Precision Plus Protein™ Standards, Bio Rad). Alíquotas 16, 17, 18 e 19: presença das frações de 42 e 29 kDa..... 50
- Figura 17.** Gráfico de dispersão mostrando relação positiva entre o ELISA padronizado e o teste usado como referência ImmunoComb FCoV (FIP)..... 53
- Figura 18.** Gráfico do estudo de soropositividade para presença de anticorpos anti-FCoV..... 53

LISTA DE ABREVIATURAS

- A:** absorvância
- BCA:** ácido bicinconínico
- bp:** pares de bases
- BSA:** albumina sérica bovina
- cDNA:** DNA complementar
- DMSO:** dimetilsulfóxido
- dNTP:** desoxibonucleotídeos trifosfatados
- ELISA:** Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
- FIP:** Feline infectious peritonitis
- FIVP:** Feline infectious peritonitis virus (vírus da peritonite infecciosa felina)
- FCoV:** Coronavírus felino
- FECov:** Coronavírus entérico felino
- IPTG:** isopropil 1 β -tiogalactopiranosídeo
- LB:** Meio Luria-Bertani
- LPD:** leite em pó desnatado
- N:** nucleocapsídeo
- nm:** nanômetro
- PIF:** Peritonite Infecciosa Felina
- PBS:** phosphate buffer saline (tampão fostato)
- PBST:** phosphate buffer saline (tampão fostato) + 0,05% de tween 20
- PCR:** reação em cadeia da polimerase (polymerase chain reaction)
- rpm:** rotações por minuto
- RT:** transcriptase reversa
- SDS:** sódio dodecil-sulfato
- SDS-PAGE:** sodium dodecyl sulfate polyacrilamide gel electrophoresis (eletroforese em gel de poliacrilamida de dodecilsulfato de sódio)
- TBS:** Tris Buffered Saline
- TCB:** tampão carbonato-bicarbonato
- U:** unidades
- X-gal:** 5-bromo-4-cloro-3-indolil β -galactopiranosídeo

SUMÁRIO

RESUMO.....	14
ABSTRACT.....	16
1. INTRODUÇÃO.....	18
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1. Coronavírus felino.....	19
2.2. Epidemiologia.....	21
2.3. Patogenia.....	22
2.4. Sinais clínicos.....	23
2.5. Diagnóstico.....	24
2.5. 1. Diagnóstico sorológico da infecção pelo FCoV.....	25
3. OBJETIVOS.....	26
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	27
4.1. Delineamento experimental I.....	27
4.2. Delineamento experimental II.....	28
4.3. Produção do antígeno recombinante e ELISA indireto.....	28
4.3.1. Extração de RNA, síntese de cDNA e amplificação do fragmento que codifica a proteína N do FCoV.....	28
4.3.2. Purificação dos fragmentos amplificados e sequenciamento.....	29
4.3.3. Aquisição do plasmídeo de expressão pGS21a.....	29
4.3.4. Propagação do plasmídeo pGS21a/proteína N, reação de digestão e novo sequenciamento.....	30
4.3.5. Expressão e produção da proteína recombinante.....	32
4.3.6. Purificação da proteína recombinante e quantificação.....	33
4.3.7. Diálise em membrana de celulose.....	33
4.3.8. Reação enzimática com a enteroquinase (EK).....	34
4.3.9. Western e Dot Blotting.....	35
4.3.10. Separação das frações da proteína pós-reação com EK.....	36
4.3.11. Elisa indireto.....	37
4.4.11.1. Determinação da concentração do antígeno e diluição dos soros.....	37
4.4.11.2. Teste de interferência da GST.....	37

4.4.11.3. Processamento das amostras.....	37
4.1.11.4. Análises do ELISA.....	38
4.4. Estudo soroepidemiológico.....	39
4.4.1. Animais e amostras.....	39
4.4.2. Teste sorológico.....	39
4.4.3. Análises estatísticas.....	40
5. RESULTADOS.....	41
5.1. Produção do antígeno recombinante e Elisa indireto.....	41
5.1.1. Amplificação do fragmento que codifica a proteína N do FCoV e primeiro sequenciamento.....	41
5.1.2. Propagação do plasmídeo pGS21a/prot. N, reação de digestão e novo sequenciamento.....	42
5.1.3. Expressão da proteína recombinante.....	42
5.1.4. Purificação da proteína recombinante.....	42
5.1.5. Diálise em membrana de celulose.....	44
5.1.6. Reação enzimática com a EK.....	44
5.1.7. Western e dot blotting.....	46
5.1.8. Separação das frações da proteína pós-reação com EK.....	48
5.1.9. Elisa indireto.....	51
5.1.9.1. Determinação da concentração do antígeno e diluição dos soros.....	51
5.1.9.2. Teste de interferência da GST.....	51
5.1.9.3. Processamento das amostras e análises do ELISA.....	52
5.2. Estudo soroepidemiológico.....	53
6. DISCUSSÃO.....	57
7. CONCLUSÕES.....	63
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64
9. TRABALHO CIENTÍFICO.....	72
9.1. Normas de publicação da revista.....	72
9.2. Artigo.....	77
ANEXO I.....	89

ALMEIDA, A.C.S. **Desenvolvimento do ELISA indireto com uso de proteína recombinante e estudo soroepidemiológico para infecção pelo Coronavírus felino (FCoV)**. Botucatu, 2017. 90 páginas. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

O Coronavírus felino (FCoV), ao infectar gatos domésticos (*Felis catus*), exibe uma patogenicidade bimodal, produzindo desde infecções entéricas subclínicas até a peritonite infecciosa felina (PIF), que é fatal para os gatos que a desenvolvem. A PIF é considerada uma das mais importantes doenças infecciosas dos felinos. O diagnóstico da pif não-efusiva (seca) é desafiador para ser estabelecido com o animal em vida, e o da pif efusiva (úmida) pode ser estabelecido através da associação de achados clínicos e resultados de exames laboratoriais. Técnicas sorológicas não fornecem um diagnóstico conclusivo, mas são ferramentas úteis e podem ser importantes no auxílio do manejo. O presente estudo teve como objetivos desenvolver um teste de ELISA indireto com uso do antígeno recombinante N (proteína de nucleocapsídeo) do FCoV, e também realizar um estudo soroepidemiológico para infecção pelo FCoV em gatos domésticos domiciliados da cidade de Botucatu, SP. Para o ELISA indireto o antígeno foi produzido através de clonagem e expressão em bactéria. Testes de concentração do antígeno e diluição dos soros foram realizados. Cento e cinquenta e uma amostras foram testadas. O ponto de corte foi determinado através do cálculo da média aritmética da A_{450} de 53 amostras negativas (testadas pelo kit ImmunoComb FCoV (FIP) – teste referência do estudo), mais 4 desvios padrão. Para o estudo soroepidemiológico, foram testadas as mesmas 151 amostras, agora pelo kit ImmunoComb FCoV (FIP) para detecção de anticorpos IgG anti-FCoV. Os fatores de risco analisados foram faixa etária, raça, gênero, condição reprodutiva, acesso à rua e modo de criação (solitário ou em grupo). A sensibilidade relativa do ELISA foi de 85,57%, a especificidade relativa de 94,44% e a acurácia relativa de 88,74%. Para o estudo soroepidemiológico observou-se uma soropositividade de 64,24% (97/151) pelo teste ImmunoComb FCoV (FIP). Não houve significância estatística em relação aos fatores de risco raça ($p=1,000$), gênero ($p=0,0818$) e viver solitário ou em grupo ($p=0,8325$). Já os fatores de risco faixa etária ($p=0,0157$), condição reprodutiva ($p=0,0074$) e acesso à rua ($p=0,0001$) apresentaram significância estatística quanto à soropositividade (para p -valores $\leq 0,05$). O Elisa indireto apresentou

capacidade de interação com anticorpos anti-FCoV, através do antígeno produzido, e uma boa sensibilidade, especificidade e acurácia relativa, demonstrando eficiência e capacidade discriminatória. O estudo soroepidemiológico demonstrou que o FCoV está amplamente disseminado na população de gatos estudada. A soropositividade encontrada foi maior do que a esperada, uma vez que os gatos foram amostrados de domicílios e não de abrigos ou gatis. As diferenças estatísticas encontradas para os fatores de risco faixa etária, condição reprodutiva e acesso à rua ajudam a traçar um perfil epidemiológico desta população.

PALAVRAS-CHAVE: Coronavírus, FCoV, ELISA, Soroepidemiologia, Fatores de Risco, Felinos.

ALMEIDA, A.C.S. **Development of the indirect ELISA with recombinant protein and seroepidemiological study for feline coronavirus (FCoV)**. Botucatu, 2017. 90 pages. Thesis (Doctorate) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

The feline coronavirus (FCoV) infect domestic cats (*Felis catus*) with a bimodal pathogenicity, producing from enteric subclinical infections to the fatal feline infectious peritonitis (FIP). FIP is considered one of the most important infectious diseases of felids. The diagnosis of FIP non-effusive is challenging for living animals and that of FIP effusive can be established through the association of clinical findings and results of laboratory tests. Although serological techniques do not provide conclusive diagnostics, they are useful tools and may important in helping the management. The present study aimed to develop an indirect ELISA test with the use of a nucleocapsid (N) recombinant protein of FCoV as antigen and to perform a seroepidemiological study for infection with FCoV in domiciled domestic cats from Botucatu, SP. For the indirect ELISA, the antigen was produced by cloning and vector expression using bacteria. Tests of antigen concentration and serum dilution were performed. One hundred and fifty-one samples (n=151) were tested and the cut-off determined by calculating the average at A₄₅₀ from 53 negative samples (as tested by ImmunoComb FCoV (FIP) kit – the reference test for the study) and four standard deviation. For the seroepidemiological study, 151 samples were tested ImmunoComb FCoV (FIP) for detection of IgG anti-FCoV antibodies. The analyzed risk factors were age, breed, sex, reproductive condition, outdoor access, creation mode (solitary or grouped). The relative ELISA sensitivity was 85,57%, the relative specificity was 94,44% and the relative accuracy was 88,74%. In the seroepidemiological study the seropositivity was 64,24% (97/151) by the ImmunoComb FCoV (FIP) kit. There was no statistical significance among breed (p=1,000), sex (p=0,0818) and solitary or grouped animals (p=0,8325). Age (p=0,0157), reproductive condition (p=0,0074) and outdoor access (p=0,0001) presented statistical significance concerning seropositivity (for p-values $\leq 0,05$). The indirect ELISA presented capacity of interaction with anti-FCoV antibodies by the produced antigen with good relative sensitivity, specificity and accuracy, showing efficiency and discriminatory capacity. The seroepidemiological study showed that FCoV is widely disseminated in the studied cat

population. The seropositivity encountered was higher than expected, since the sampled cats were domiciled and not shelter cats. The statistical differences encountered in age, reproductive condition and outdoor access aided in building the epidemiological profile of this population.

KEY WORDS: Coronavirus, FCoV, ELISA, Seroepidemiology, Risk factors, Feline.

1. INTRODUÇÃO

O Coronavírus felino (FCoV) é responsável por causar uma das mais importantes doenças infecciosas que acometem felinos domésticos e selvagens, a peritonite infecciosa felina (PIF), que é uma enfermidade imunomediada, sistêmica, progressiva e fatal. A PIF foi descoberta na década de 60 e, desde então, a doença tem sido relatada em todo o mundo. Há evidências que sugerem que o agente causal da PIF seja um vírus mutante do FCoV, o chamado Vírus da peritonite infecciosa felina (FIPV), enquanto o seu correspondente benigno seria o Coronavírus entérico felino (FECV), indistinguíveis entre si em relação às propriedades físicas e antigênicas. O diagnóstico da PIF não-efusiva (seca) continua a ser desafiador, sendo considerado um dos mais difíceis de se estabelecer com o animal em vida. Já o diagnóstico da PIF efusiva (úmida) pode ser estabelecido através da associação de achados clínicos e resultados de exames laboratoriais. Muitos estudos de soroprevalência demonstraram que a infecção pelo FCoV é extremamente comum em gatos domésticos, estando os anticorpos presentes em cerca de 80 a 90% dos gatos que vivem em abrigos ou gatis, e estima-se que 5 a 10% desses gatos soropositivos desenvolverão a doença e morrerão de PIF.

Investigações sobre a soroprevalência da infecção por FCoV e por outros agentes virais importantes para a medicina felina, como o Vírus da leucemia felina (FeLV) e Vírus da imunodeficiência felina (FIV), contribuem para o controle destes agentes na medida em que se identificam fatores de risco e desenvolvem-se estratégias para prevenção da infecção. No Brasil, relativamente poucos gatos são investigados laboratorialmente para exposição ou infecção pelo FCoV, exceto por determinados gatis que adotam um padrão sanitário mais elevado. Via de regra, os gatos domiciliados apenas são investigados laboratorialmente se manifestarem sinais clínicos.

Apesar da existência de testes de detecção e quantificação de anticorpos contra o FCoV, estes são importados e apresentam custos elevados para uso em larga escala. Isso porque além da necessidade de utilização de reagentes importados e onerosos, muitos dos laboratórios enviam as amostras para serem testadas no exterior. Por isso, o desenvolvimento de uma técnica quantitativa para detecção de anticorpos anti-FCoV é de grande importância, onde será possível oferecer um serviço de baixo custo com qualidade e rapidez, e com o estudo soroepidemiológico se obter dados nacionais (que são escassos) sobre a soropositividade e fatores de risco para infecção pelo FCoV.

7. CONCLUSÕES

O antígeno recombinante proteína N do FCoV foi produzido e aplicado na técnica de ELISA indireto, demonstrando que é antigênico, apresentando capacidade de interação com anticorpos de gatos naturalmente infectados pelo FCoV. A técnica apresentou valores satisfatórios de sensibilidade, especificidade e acurácia relativa, demonstrando boa eficiência e capacidade discriminatória.

O estudo soroepidemiológico demonstrou que o FCoV está amplamente disseminado na população de gatos estudada. A soropositividade encontrada foi maior do que a esperada, uma vez que os gatos foram amostrados de domicílios, e não de abrigos ou gatis. Dentre os fatores de risco avaliados, aqueles que apresentaram diferenças estatísticas foram faixa etária, condição reprodutiva e acesso à rua, ajudando assim, a se traçar um perfil epidemiológico da população estudada.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADDIE, D. D.; McLACHLAN, S.A.; GOLDER, M.; RAMSEY, I.; JARRETT, O. Evaluation of an in-practice test for feline coronavirus antibodies. *Journal of Feline Medicine and Surgery*. v. 6, p. 63-67, 2004a

ADDIE, D. D.; PALTRINIERI, S.; PEDERSEN, N. C. Recommendations from workshops of the second international feline coronavirus/feline infectious peritonitis symposium. *Journal of Feline Medicine and Surgery*. v. 6, n. 2, p. 125-130, 2004b.

ADDIE, D.D.; JARRETT, O. Feline Coronavirus Infections. In: GREENE, C.E. *Infectious Diseases of the Dog and the Cat*. 3 ed. St. Louis: Saunders Elsevier, 2006. Cap. 11, p. 88-102.

ADDIE, D.D.; LE PODER, S.; BURR, P.; DECARO, N.; GRAHAM, E.; HOFMANN-LEHMANN, R.; JARRETT, O.; McDONALD, M.; MELI, M.L. Utility of feline coronavirus antibody tests. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, v.17, n.2, p.152-162, 2015. DOI: 10.1177/1098612X14538873.

AKKAN, H.A.; KARACA, M. Studies on the seroprevalence, age, and gender on the distribution of feline coronavirus in Van Cat kept in a multiple-cat environment. *Bull Vet Inst Pulawy*, v.53, p.183-186, 2009.

BATTILANI, M.; BALBONI, A.; BASSANI, M. et al. Sequence analysis of the nucleocapsid gene of feline coronaviruses circulating in Italy. *New Microbiologica*, v.33, p.387-392, 2010.

BROWN, M. A.; TROYER, J. L.; PECON-SLATTERY, J.; ROELKE, M. E.; O'BRIEN, S. J. Genetics and pathogenesis of feline infectious peritonitis virus. *Emerging Infectious Diseases*, v.15, p.1445- 1452, 2009.

CAN-SAHNA, Z.; ATASEVEN, V.S.; PINAR, D.; OGUZOGLU, T.Ç. The detection of feline coronaviruses in blood samples from cats by mRNA RT-PCR. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, v.9, p.369-372, 2007.

CARATTOLI, A.; DI BONITO, P.; GRASSO, F.; GIORGI, C.; BLASI, F.; NIEDRIG, M.; CASSONE, A. Recombinant Protein-Based ELISA and Immuno-Cytochemical Assay for the Diagnosis of SARS. *Journal of Medical Virology*. v. 76, p. 137–142, 2005.

COMENALE, G. Expressão e purificação da proteína recombinante L2 do Papilomavírus bovino tipo-2 em sistema bacteriano. 2012. 67f. *Dissertação (Mestrado)* – Universidade de São Paulo (USP), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, São Paulo.

CORNELISSEN, E.; DEWERCHIN, H.L.; VAN HAMME, E.; NAUWYNCK, H.J. Absence of surface expression of feline infectious peritonitis virus antigens on infected cells isolated from cats with FIP. *Veterinary Microbiology*, v.121, p.131-137, 2007.

DAIHA, M.C. Peritonite Infecçiosa Felina. In: SOUZA, H.J.M. *Coletâneas em Medicina e Cirurgia Felina*. Rio de Janeiro: L.F. Livros de Veterinária, 2003. p.363-373.

FOLEY, J.E. e PEDERSEN, N.C. The inheritance of susceptibility to feline infectious peritonitis in purebred catteries. *Feline Practice*, v. 24, p. 14–22, 1996.

FOLEY, J. E.; POLAND, A.; CARLSON, J.; PEDERSEN, N. C. Patterns of feline coronavirus infection and fecal shedding from cats in multiple-cat environments. *Journal of American Veterinary Medical Association*, v.210, n.9, p.1307-1312, 1997a.

FOLEY, J. E.; POLAND, A.; CARLSON, J.; PEDERSEN, N.C. Risk factors for feline infectious peritonitis among cats in multiple-cat environments with endemic feline enteric coronavirus. *Journal of American Veterinary Medical Association*, v.210, n.9, p.1313-1318, 1997b.

GIORI, L.; GIORDANO, A.; GIUDICE, C.; GRIECO, V.; PALTRINIERI, S. Performances of different diagnostic tests for feline infectious peritonitis in challenging clinical cases. *Journal of Small Animal Practice*, v.52, p.152-157, 2011.

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. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v.17, p.781-790, 2003.

HARTMANN, K. Feline infectious peritonitis. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, v.35, n.1, p.39-79, 2005.

HERREWEGH, A.A.P.M.; GROOT, R.J.; CEPICA, A.; EGBERINK, H.F.; HORZINEK, M.C.; ROTTIER, P.J.M. Detection of feline coronavirus RNA in feces, tissues, and body fluids of naturally infected cats by reverse transcriptase PCR. **Journal Clinical Microbiology**, v.33, n.3, p. 684-689, 1995.

HORA, A.S.; ASANO, K.M.; GUERRA, J.M.; MESQUITA, R.G.; MAIORKA, P.; RICHTZENHAIN, L.J.; BRANDÃO, P.E. Intrahost Diversity of Feline Coronavirus: A Consensus between the Circulating Virulent / Avirulent Strains and the Internal Mutation Hypotheses?. *The Scientific World Journal*, 2013. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/tswj/2013/572325/>>. Acesso em : 30 mai. 2013. DOI: 10.1155/2013/572325.

HORA, A.S.; TONIETTI, P.O.; TANIWAKI, S.A.; ASANO, K.M.; MAIORKA, P.; RICHTZENHAIN, L.J.; BRANDÃO, P.E. Feline Coronavirus 3c Protein: A Candidate for a Virulence Marker? *BioMed Research International*, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1155/2016/8560691>>. Acesso em: 10 junho. 2016.

HORZINEK, M.; ADDIE, D.; BÉLAK, 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.;

SPARKES, A.; THIRY, E.; TRUYEN, U.; *ABCD Guidelines on Feline Infectious Peritonitis. European Advisory Board on Cat Diseases*, p.1-30, 2008.

HOSKINS, J.D.; LOAR, A.S. Feline infectious diseases. *Veterinary Clinics of North America*, v.23, n.1, p.2-11, 1993.

KIM, Y.; LIU, H.; KANKANAMALAGE, A.C.G.; WEERASEKARA,S.; HUA, D.H.; GROUTAS, W.C.; CHANG, K.; PEDERSEN, N.C. Reversal of the progression of fatal coronavirus infection in cats by a broad-spectrum coronavirus protease inhibitor. *PLOS Pathogens*, 2016. DOI:10.1371/journal.ppat.1005531.

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

KIPAR, A.; MELI, M.L. Feline infectious peritonitis: Still an enigma? *Veterinary Pathology*. v.51, n.2, p. 505-526, 2014.

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. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, v.12, n10, p. 1209-1215, 2005.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v.227, n.5259, p.680-685, 1970.

LAI, M. M. C.; HOLMES, K. Coronaviridae: the viruses and their replication. In: *Fields Virology*, 4. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001.p. 951-969.

LE PODER, S. Feline and Canine Coronaviruses: Common Genetic and Pathobiological Features. *Advances in Virology*, 2011. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/av/2011/609465/>>. Acesso em : 20 mai. 2013. DOI: 10.1155/2011/609465.

MALIK, E.B.; NORRIS, J.M. The relationship between the Feline Coronavirus antibody titre and the age, breed, gender and health status of Australian cats. *Australian Veterinary Journal* Volume, v.84, n. 1 e 2, 2006.

MOTA, A.L.D.R. Relação entre apresentação clínica, carga viral e titulação de anticorpos na peritonite infecciosa felina. 2010. 112 f. *Dissertação (Mestrado)* – Universidade Técnica de Lisboa, Faculdade de Medicina Veterinária, Lisboa, Portugal.

MYRRHA, L.W.; SILVA, F.M.F.; PETERNELLI, E.F.O.; JUNIOR, A.S.; RESENDE, M.; ALMEIDA, M.R. The Paradox of Feline Coronavirus Pathogenesis: A Review. *Advances in Virology*, 2011. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/av/2011/109849/>>. Acesso em: 20 nov. 2011. DOI: 10.1155/2011/109849.

NORSWORTHY, G.D. Feline infectious peritonitis. In: NORSWORTHY, G.D.; CRYSTAL, M.A.; GRACE, S.F.; TILLEY, L.P. *The Feline Patient*, 3rd. Oxford: Blackwell Publishing, 2006. p.97-98

PEDERSEN, N. C. Virologic and immunologic aspects of feline infectious peritonitis virus infection. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, v.218, p.529-550, 1987.

PEDERSEN, N.C. A review of feline infectious peritonitis virus infection: 1963-2008. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, v.11, p.225-258, 2009.

PEDERSEN, N.C.; LIU, H.; DODD, K.A.; PESAVENTO, P. Significance of Coronavirus Mutants in Feces and Diseased Tissues of Cats Suffering from Feline Infectious Peritonitis. **Viruses**. v.1 , p. 166-184, 2009.

PEDERSEN, N.C.; ECKSTRAND, C.; LIU, H.; LEUTENEGGER, C.; MURPHY, B. Levels of feline infectious peritonitis virus in blood, effusions, and various tissues and the role of lymphopenia in disease outcome following experimental infection. *Veterinary Microbiology*, v.175, p.157-166, 2015.

PESTEANU-SOMOGYI, L.D.; RADZAI, C.; PRESSLER, B.M. Prevalence of feline infectious peritonitis in specific cat breeds. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, v.8, p. 01-05, 2006.

PRATELLI, A.; ELIA, G.; MARTELLA, V.; PALMIERI, A.; CIRONE, F.; TINELLI, A.; CORRENTE, M.; BUONAVOGLIA, C. Prevalence of canine coronavirus antibodies by enzyme-linked immunosorbent assay in dogs in the south of Italy. *Journal of Virological Methods*. v. 102, p. 67-71, 2002.

PRATELLI, A. Comparison of serologic techniques for detection of antibodies against feline coronaviruses. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v.20, p.45-50, 2008.

PRATELLI, A.; YESILBAG, K.; SINISCALCHI, M.; YALÇM, E.; YILMAZ, Z. Prevalence of feline coronavirus antibodies in cats in Bursa province, Turkey, by an enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, v.11, p.881-884, 2009.

OLIVEIRA, F.N.; RAFFI, M.B.; SOUZA, T.M.; BARROS, C.S.L. Peritonite infecciosa felina: 13 casos. **Ciência Rural**. v.33, n.5; p. 905-911, 2003.

ROBISON, R.L.; HOLZWORTH, J.; GILMORE, C..E. Naturally occurring feline infectious peritonitis: signs and clinical diagnosis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 158, p. 981-986, 1971.

ROHRBACH, B.W.; LEGENDRE, A.M.; BALDWIN, C.A.; LEIN, D.H.; REED, W.M.; WILSON, R.B. Epidemiology of feline infectious peritonitis among cats examined at veterinary medical teaching hospitals. *Journal of the American Veterinary Medicine Association*, v. 218, n. 7, p. 1111–1115, 2001.

SAMBROOK, J; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. In: **Molecular Cloning: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SATOH, R.; FURUKAMA, T.; KOTAKE, M.; TAKANO, T.; MOTOKAWA, K.; GEMMA, T.; WATANABE, R.; ARAI, S.; HOHDATSU, T. Screening and identification of T helper 1 and linear immunodominant antibody-binding epitopes in the spike 2 domain and the nucleocapsid protein of feline infectious peritonitis virus. *Vaccine*, v.29, p.1791-1800, 2011.

SHIBA, N.; MAEDA, K.; KATO, H.; MOCHIZUKI, M.; IWATA, H. Differentiation of feline coronavirus type I and II infections by virus neutralization test. *Veterinary Microbiology*, v.124, p.348-352, 2007.

SMITH, P.K.; KROHN, R.I.; HERMANSON, G.T.; MALLIA, A.K.; GARTNER, F.H.; PROVENZANO, M.D.; FUJIMOTO, E.K.; GOEKE, N.M.; OLSON, B.J.; KLENK, D.C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.*, v.150, n.1, p.76-85, 1985.

SPARKES, A. H. Infecção por coronavírus felino. In: CHANDLER, E.A.; GASKELL, C.J.; GASKELL, R.M. *Clínica e Terapêutica em Felinos*, 3ª. edição. São Paulo: Roca, 2006. Cap. 25, p.508-518, 632 p.

SYKES, J.E. Immunodeficiencies caused by Infectious Diseases. *Veterinary Clinics of Small Animal*, v.40, p.409-423, 2010.

TIMANI, K.A.; YE, L.; YE, L.; ZHU, Y.; WU, Z.; GONG, Z. Cloning, sequencing, expression, and purification of SARS-associated coronavirus nucleocapsid protein for serodiagnosis of SARS. *Journal of Clinical Virology*. v.30, p. 309-312, 2004.

VENNEMA, H.; POLAND, A.; HAWKINS, K.F. et al. A comparison of the genomes of FECV and FIPV and what they tell us about the relationships between feline coronaviruses and their evolution. *Feline Practice*, v.23, p.40-44, 1995.

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.

WOO, P.C.Y.; LAU, S.K.P.; WONG, L.B.H.L.; TSOI, H.W.; FUNG, A.M.Y.; CHAN, K.H.; TAM, V.K.P.; PEIRIS, J.S.M.; YUEN, K.Y. Detection of Specific Antibodies to Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) Coronavirus Nucleocapsid Protein for Serodiagnosis of SARS Coronavirus Pneumonia. *Journal of Clinical Microbiology*. v.42, n.5, p. 2306-2309, 2004.

WOO, P.C.Y.; HUANG, Y.; LAU, S.K.P.; YUEN, K.Y. Coronavirus Genomics and Bioinformatics Analysis. *Viruses*, v.208, p.1804-1820, 2010.

WORTHING, K.A.; WIGNEY, D.I.; DHAND, N.K.; FAWCETT, A.; McDONAGH, P.; MALIK, R.; NORRIS, J.M. Risk factors for feline infectious peritonitis in Australian cats. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, v. 14, n. 6, p. 405–412, 2012.

ZANUTTO, M.S.; HAGIWARA, M.K. Peritonite infecciosa em gatos – relato de caso. *Veterinária Notícias*, v.13, n.2, p.63-69, 2007.