

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 TÉCN. 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<sup>a</sup> Taís Fukuta da Cruz

Membro

Departamento de Microbiologia e Imunologia

IBTEC – IBB – UNESP – BOTUCATU

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> 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

|                   |   |    |
|-------------------|---|----|
| <b>Tabela 1.</b>  | Primers utilizados na amplificação do fragmento que codifica a proteína N do FCoV.....  | 29 |
| <b>Tabela 2.</b>  | Primers utilizados para o sequenciamento.....   | 32 |
| <b>Tabela 3.</b>  | Testes de concentração de antígeno e diluição de soros.....   | 51 |
| <b>Tabela 4.</b>  | Teste de interferência da GST.....  | 52 |
| <b>Tabela 5.</b>  | 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 |
| <b>Tabela 6.</b>  | 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 |
| <b>Tabela 7.</b>  | Significância estatística (p-valor) para cada variável.....   | 54 |
| <b>Tabela 8.</b>  | Regressão logística (p-valor) com as variáveis significativas analisadas em conjunto.....   | 55 |
| <b>Tabela 9.</b>  | Significância estatística da diferença entre diversas categorias das variáveis faixa etária, condição reprodutiva e acesso à rua.....                                   | 55 |
| <b>Tabela 10.</b> | 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 GStrap 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 GStrap 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 $\beta$ -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  $\beta$ -galactopiranosídeo

## SUMÁRIO

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

|   |           |
|---|-----------|
| 4.4.11.3. Processamento das amostras.....   | 37        |
| 4.1.11.4. Análises do ELISA.....  | 38        |
| <b>4.4. Estudo soroepidemiológico.....</b>  | <b>39</b> |
| 4.4.1. Animais e amostras.....  | 39        |
| 4.4.2. Teste sorológico.....  | 39        |
| 4.4.3. Análises estatísticas.....   | 40        |
| <b>5. RESULTADOS.....</b>   | <b>41</b> |
| <b>5.1. Produção do antígeno recombinante e Elisa indireto.....</b>                               | <b>41</b> |
| 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        |
| <b>6. DISCUSSÃO.....</b>  | <b>57</b> |
| <b>7. CONCLUSÕES.....</b>   | <b>63</b> |
| <b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>   | <b>64</b> |
| <b>9. TRABALHO CIENTÍFICO.....</b>  | <b>72</b> |
| 9.1. Normas de publicação da revista.....   | 72        |
| 9.2. Artigo.....  | 77        |
| <b>ANEXO I.....</b>   | <b>89</b> |

ALMEIDA, A.C.S. **Desenvolvimento do ELISA indireto com uso de proteína recombinante e estudo soropidemiológico 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 soropidemiológico 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 soropidemiológico, 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 soropidemiológico 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  $\leq$  a 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 A<sub>450</sub> 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 ≤ 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.

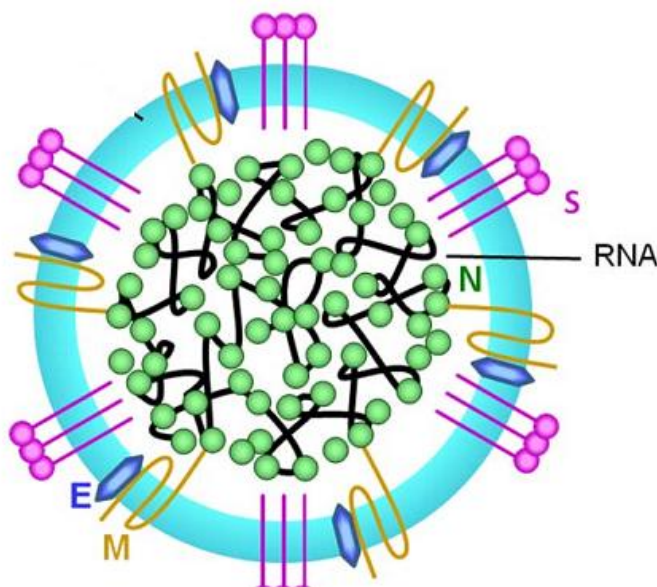
Apesar da existência de testes de detecção e quantificação de anticorpos contra o FCoV, estes são importados e apresentam custos elevados para uso em larga escala. Isso porque além da necessidade de utilização de reagentes importados e onerosos, muitos dos laboratórios enviam as amostras para serem testadas 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 soropidemiológico se obter dados nacionais (que são escassos) sobre a soropositividade e fatores de risco para infecção pelo FCoV.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Coronavírus felino

O Coronavírus felino (FCoV) pertence à ordem *Nidovirales*, família *Coronaviridae*, gênero *Alphacoronavirus*. São vírus envelopados contendo RNA de fita simples e polaridade positiva. Contêm o maior genoma de RNA conhecido, e por este motivo são vírus altamente sujeitos a mutação espontânea durante a replicação (SPARKES, 2006; PRATELLI, 2008).

A estrutura genômica de todos os coronavírus é semelhante, sendo que o genoma do FCoV apresenta aproximadamente 29.000 nucleotídeos (PEDERSEN, 2009). Apresentam 11 ORFs (*open reading frames* ou fases de leitura aberta), sendo duas grandes ORFs codificantes da polimerase, quatro ORFs codificantes das proteínas estruturais de espícula (S), membrana (M), nucleocapsídeo (N) e envelope (E) e, cinco ORFs codificantes das proteínas não estruturais 3a, 3b, 3c, 7a e 7b (Figura 1) (ADDIE *et al.*, 2004b; MYRRHA *et al.*, 2011).



**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.

A glicoproteína S é multifuncional e desempenha um papel central na biologia e patogênese da infecção por FCoV. São as responsáveis por dar a esta família de vírus a aparência de coroa (microscopia eletrônica), e são utilizadas para a ligação ao receptor e para a entrada viral, além de apresentarem as sequências mais variáveis no genoma do coronavírus (WOO *et al.*, 2010). A proteína M é a proteína estrutural mais abundante e apresenta funções importantes relacionadas com a ligação do vírus às células, e com a imunidade do hospedeiro mediada por células, bem como a indução de anticorpos-dependentes (PRATELLI, 2008; WOO *et al.*, 2010). A proteína N (42-60 kDa) é uma das mais abundantes produzidas durante a infecção viral, e desempenha um importante papel na replicação viral, montagem e na imunidade do hospedeiro, além de ser bastante conservada e altamente imunogênica. O seu uso para clonagem e produção de proteínas recombinantes em ensaios sorológicos é bastante comum (LAI e HOMES, 2001; BATILLANI *et al.*, 2010; WOO *et al.*, 2010).

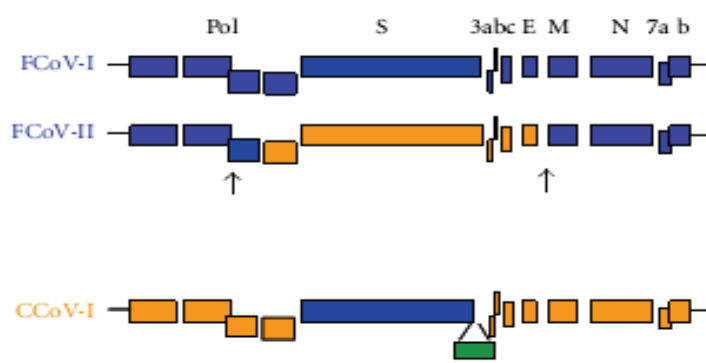
O FCoV é responsável por causar uma das mais importantes doenças infecciosas que acometem felinos domésticos e selvagens, a peritonite infecciosa felina (PIF), que é uma enfermidade infecciosa, imunomediada, sistêmica, progressiva e fatal (ADDIE e JARRETT, 2006). Foi descrita pela primeira vez no ano de 1963, no Angell Memorial Animal Hospital, Boston, Estados Unidos, pelo Dr. Jean Holzworth. Desde então, a doença tem sido relatada em todo o mundo (PEDERSEN, 2009; LE PODER, 2011). Outros coronavírus causam doenças respiratórias e entéricas prevalentes em humanos e animais domésticos (LAI e HOMES, 2001; KIM *et al.*, 2016).

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. A mutação do FECV ocorreria ao acaso durante o curso da infecção entérica, na qual o vírus adquiriria a capacidade de replicar-se em macrófagos, fato que possibilitaria a viremia e disseminação sistêmica (ADDIE e JARRETT, 2006; NORSWORTHY *et al.*, 2006; CORNELISSEN *et al.*, 2007). Uma hipótese alternativa ainda sugere que ambas as variantes circulam na natureza (BROWN *et al.*, 2009; HORA *et al.*, 2013).

O FCoV é classificado em dois sorotipos virais, I e II, baseados nas suas características de crescimento nas culturas de células, citopatogenicidade e reatividade com anticorpos neutralizantes. O sorotipo I é observado particularmente em felinos e se

replica pobremente em culturas de células, sendo o mais comum na natureza, responsável por 70% a 80% das infecções em felinos. O sorotipo II é resultante da recombinação entre o sorotipo I e o coronavírus canino, replicando-se bem em culturas de células. Ambos os sorotipos podem causar sinais clínicos nos gatos domésticos, que variam desde infecções assintomáticas, sinais entéricos ou de PIF (ADDIE e JARRETT, 2006; SPARKES, 2006; SHIBA *et al.*, 2007; PRATELLI *et al.*, 2009).

Na Figura 2, demonstra-se um esquema representativo das relações genéticas entre o FCoV e o CCoV (coronavírus canino) e os possíveis sítios de recombinação que dão origem ao sorotipo II do FCoV (LE PODER, 2011).



**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).

## 2.2. Epidemiologia

A infecção por FCoV apresenta ampla distribuição nos felinos domésticos e também pode ser observada nos felinos selvagens. A PIF é mais frequente em ambientes com alta concentração de felinos, pois é onde há maiores taxas de infecção viral e disseminação de variantes FIPV, expondo os animais a elevadas doses infectantes (HOSKINS e LOAR, 1993; FOLEY *et al.*, 1997b). O FCoV é mantido nas populações de felinos por intermédio dos animais que atuam como carreadores crônicos

(eliminadores do vírus), que correspondem a cerca de 20% dentro de um ambiente populoso (HARTMANN, 2005). Estes animais eliminam vírus persistentemente por longos períodos, e a detecção destes portadores é importante para que eles possam ser removidos do ambiente e separados.

É um vírus altamente contagioso, possuindo alta prevalência em gatis e abrigos de felinos. Estudos de soroprevalência demonstraram que anticorpos estão presentes em cerca de 80 a 90% dos gatos que vivem nestes ambientes e, estima-se que 5 a 10% desses gatos soropositivos desenvolverão a doença e morrerão de PIF (HERREWEGH *et al.*, 1995; KUMMROW *et al.*, 2005; ADDIE e JARRETT, 2006; PEDERSEN, 2009).

Ambos os sorotipos são transmitidos por via fecal-oral e geralmente causam infecções intestinais leves. O vírus persiste no intestino de gatos saudáveis e pode ser eliminado de forma contínua ou intermitente no ambiente, durante meses a anos (NORSWORTHY *et al.*, 2006).

A ocorrência da PIF é maior em gatos jovens, com predomínio em animais entre três meses e três anos de idade (ADDIE e JARRETT, 2006). No entanto, podem ocorrer casos em gatos com mais de 10 anos, associados ao declínio da resposta imune (ROHRBACH *et al.*, 2001). Alguns fatores podem influenciar o aparecimento da PIF, tais como o estresse, estado imunológico, uso de corticóides, histórico de cirurgias, dose infectante e virulência da cepa viral, entre outros (DAIHA, 2003; OLIVEIRA *et al.*, 2003).

### **2.3. Patogenia**

A patogenia da doença é complexa e até os dias atuais ela permanece incerta (PEDERSEN, 2009; MYRRHA *et al.*, 2011). Sabe-se que o gato infecta-se com o FCoV por via oronasal. O vírus atinge então o intestino, onde se replica no citoplasma dos enterócitos maduros localizados no topo das vilosidades intestinais, causando infecção que pode ser assintomática ou pode ocorrer diarreia devido à morte dessas células (ADDIE e JARRETT, 2006; PEDERSEN *et al.*, 2009). Entretanto, a infecção pode tomar rumos diferentes nos animais. Para explicar isto, algumas hipóteses são sugeridas.

A primeira e mais estudada, chamada teoria da mutação interna, considera que o FECV localizado nos enterócitos apresenta capacidade de se replicar em macrófagos e

invadir os tecidos intestinais e o sangue, de modo que a sua presença no sangue e nos tecidos levaria à replicação contínua e propiciaria o surgimento de cepas mutantes com virulência aumentada (VENNEMA *et al.*, 1998). Outras teorias propostas estão relacionadas com fatores virais e do hospedeiro, são elas: surgimento de quasispecies; resposta imune do animal estaria implicada no desenvolvimento da doença; existência de estirpes circulantes virulentas e avirulentas distintas (MYRRHA *et al.*, 2011).

Os gatos que apresentam uma forte resposta imune mediada por células não desenvolvem a PIF. Entretanto, gatos que apresentam predominantemente uma resposta humoral progridem para a doença. Acredita-se que a resposta mediada por células T, seja a única resposta imune eficiente contra a progressão da doença (PEDERSEN, 1987; VENEMMA *et al.*, 1995; SATOH *et al.*, 2011). A patogenia da PIF está intimamente associada à resposta imunológica do animal, e envolve a depleção de células T, característica compartilhada por alguns outros coronavírus, como o da Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS) (KIM *et al.*, 2016). O mecanismo de depleção das células T não é claro, porque o vírus não infecta linfócitos, somente macrófagos e monócitos (SYKES, 2010). Um decréscimo nos linfócitos do sangue tem sido previamente associado com sinais de doença na infecção experimental por FIPV e vários graus de linfopenia têm sido detectados, sendo considerado como uma característica comum na ocorrência natural da PIF (PEDERSEN, 2009; PEDERSEN *et al.*, 2015).

A existência de marcadores genéticos para diferenciar o FIPV do FECV é um tema do mais alto interesse, não só pelo ponto de vista clínico e epidemiológico, mas também como base para uma melhor compreensão da patogenia da doença, que é altamente complexa (HORA *et al.*, 2016).

#### **2.4. Sinais Clínicos**

Os sinais clínicos que ocorrem na PIF são provenientes diretamente da vasculite e do dano isquêmico causado nos órgãos em decorrência das lesões nos vasos que os irrigam. A PIF é classificada em duas formas: uma efusiva (úmida), caracterizada por vasculite e poliserosite, e uma forma não-efusiva (seca), (KIPAR *et al.*, 2005).

Na PIF efusiva, o animal pode apresentar acúmulo de líquido no abdômen, tórax e saco pericárdico, abdômen distendido, dispnéia, taquipnéia, abafamento de sons

cardíacos. A PIF não-efusiva é a forma crônica da doença, com a formação de lesões piogranulomatosas nos rins, fígado, pulmões, baço, sistema nervoso central, trato gastrointestinal, olhos, pâncreas, pele, coração. Os gatos que apresentam sinais clínicos evidentes de PIF provavelmente não sobreviverão por mais de 12 meses, pois não há tratamento efetivo e o curso da doença resulta em óbito do animal (HARTMANN, 2005).

## 2.5. Diagnóstico

O diagnóstico antemortem da PIF é desafiador, pois não existe um teste disponível que seja sensível e específico. Como o vírus é altamente prevalente nas populações felinas, muitos gatos são positivos para FCoV nos testes sorológicos e de amplificação de DNA com o uso da enzima transcriptase reversa (RT-PCR) (CANSAHNA *et al.*, 2007). Um diagnóstico conclusivo não pode basear-se exclusivamente na sorologia ou na RT-PCR, os quais detectam a resposta humoral ou a presença do vírus, respectivamente. Estas técnicas vão fornecer apenas informações sobre a infecção e não sobre uma possível evolução para o desenvolvimento da PIF (GIORI *et al.*, 2011).

A presença do FCoV ou de anticorpos na corrente sanguínea não podem ser considerados marcadores diagnósticos eficientes para a PIF, eles indicam apenas o estado de portador ou a ocorrência de exposição ao agente. Animais sistemicamente infectados podem permanecer saudáveis e representar uma fonte constante de disseminação do FCoV (HERREWEGH *et al.*, 1995; FOLEY *et al.*, 1997a)

As dificuldades em diagnosticar de forma definitiva a PIF são decorrentes da variabilidade das manifestações clínicas (sinais são inespecíficos), do período de incubação, da ausência de alterações hematológicas e bioquímicas patognômicas, e da baixa sensibilidade e especificidade dos testes utilizados rotineiramente (HARTMANN, 2005).

Em muitos casos, o diagnóstico presuntivo pode ser feito através da avaliação do histórico, achados clínicos, título de anticorpos para coronavírus, exames laboratoriais tais como hemograma (pode ser detectado um quadro de leucocitose ou leucopenia, neutrofilia, linfopenia, anemia, trombocitopenia); bioquímicos (relação albumina/globulina, alterações de enzimas renais e hepáticas, hiperproteinemia, hiperglobulinemia, aumento das proteínas de fase aguda); avaliação da efusão (amarela,

consistência viscosa, presença de coágulos e fibrina, classificada como transudato não modificado ou exsudato não séptico) e exclusão de doenças semelhantes (HARTMANN, 2005; PEDERSEN, 2009; KIPAR e MELI, 2014).

O diagnóstico definitivo é feito através da necropsia (presença de piogranulomas, superfícies dos órgãos abdominais e torácicos cobertas por pequenas placas de fibrina esbranquiçadas) e histopatologia (vasculite caracterizada microscopicamente - necrose e infiltração perivascular de células mononucleares, linfócitos e macrófagos proliferativos, plasmócitos e neutrófilos, ao redor de arteríolas e vênulas). (HARTMANN *et al.*, 2003; ADDIE e JARRETT, 2006; KIPAR e MELI, 2014).

### **2.5.1. Diagnóstico sorológico da infecção pelo FCoV**

Os testes para detecção de anticorpos anti-FCoV são úteis para uma variedade de situações dentro da veterinária, como por exemplo, monitorar o tratamento; diagnóstico de gastroenterite causada por FCoV; avaliação de um gato saudável que tenha entrado em contato com um gato suspeito ou soropositivo; avaliação da infecção em um gato antes de introduzi-lo em um novo ambiente; monitorar os níveis de anticorpos de felinos que vivem em ambientes populosos, sendo possível realizar a separação de animais positivos (ADDIE *et al.*, 2015). A sorologia também pode ser importante para o acompanhamento de surtos em gatis e, principalmente, para o monitoramento desses gatis até que eles se tornem livres da infecção pelo FCoV (ZANUTTO e MITIKA, 2007).

Dentre os testes que são realizados estão imunofluorescência indireta, técnica de neutralização viral, prova de imunoadsorção enzimática (ELISA), teste imunocromatográfico rápido (RIM) (PEDERSEN, 2009; ADDIE *et al.*, 2015). Uma abordagem flexível é importante ao selecionar o teste que será realizado para detecção de anticorpos anti-FCoV. Deve-se buscar o teste mais adequado para a situação, em vez de adotar um único teste como padrão (ADDIE *et al.*, 2015).

### 3. OBJETIVOS

Este estudo teve como objetivos:

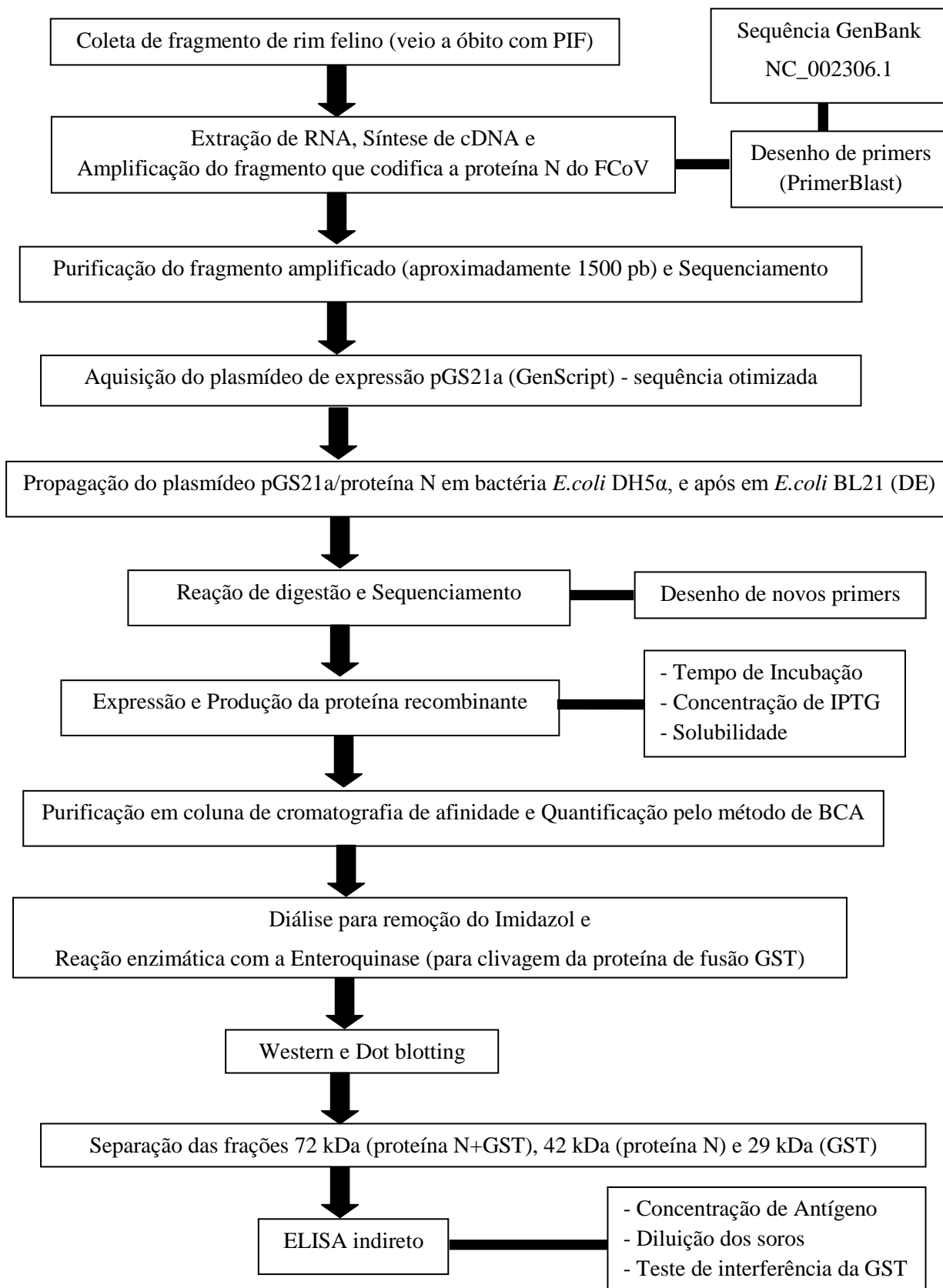
I) Produzir o antígeno recombinante N (proteína de nucleocapsídeo) do FCoV, através de um sistema heterólogo de expressão.

II) Padronizar um teste de ELISA indireto com uso de antígeno recombinante para detecção e quantificação de anticorpos anti-FCoV em soros de gatos naturalmente infectados.

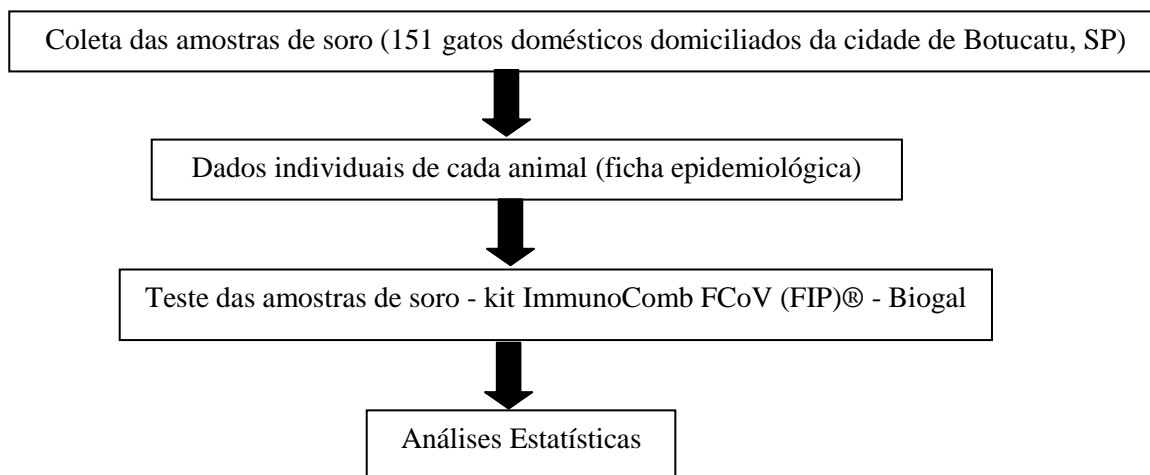
III) Realizar um estudo soropidemiológico para presença de anticorpos anti-FCoV em gatos domésticos domiciliados da cidade de Botucatu, São Paulo, Brasil.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Delineamento experimental I



## 4.2. Delineamento experimental II



## 4.3. Produção do antígeno recombinante e ELISA indireto

### 4.3.1. Extração de RNA, síntese de cDNA e amplificação do fragmento que codifica a proteína N do FCoV.

O RNA viral foi extraído a partir de um fragmento de rim de felino doméstico que veio a óbito com PIF (confirmado por histopatologia), utilizando TRIZOL (Invitrogen®) seguindo as recomendações do fabricante.

Com o acesso NC\_002306.1 (GenBank), primers para amplificar o fragmento que codifica a proteína N do FCoV foram desenhados utilizando a ferramenta do Primer Blast. Os primers descritos na Tabela 1, 1-F e 1-R amplificam todo o fragmento da proteína N (incluindo o códon iniciador e o códon terminador) totalizando 1413 pb, enquanto os primers 2-F e 2-R amplificam uma parte interna da proteína N totalizando 476 pb.

Para a síntese do cDNA e amplificação do fragmento desejado foi utilizado o kit LongRange 2Step RT-PCR (QIAGEN®) seguindo as recomendações do fabricante. Após a PCR, o produto amplificado foi analisado por eletroforese em gel de agarose a 1% e corado com SYBR® Safe DNA gel Stain (Invitrogen®).

**TABELA 1:** Primers utilizados na amplificação do fragmento que codifica a proteína N do FCoV.

| Primer     | Sequência (5'→3')        | Tamanho | Nº acesso   |
|------------|--------------------------|---------|-------------|
| <b>1-F</b> | GCAACTACTGCCACAGGATGGGC  | 1413 pb | NC_002306.3 |
| <b>1-R</b> | CGCAGACTACTGTTCAGGCACACC |         |             |
| <b>2-F</b> | TGGGTTGCAAGGGATGGTGCC    | 476 pb  | NC_002306.3 |
| <b>2-R</b> | TGAGGGTAGCATTGGCAGCG     |         |             |

#### 4.3.2. Purificação dos fragmentos amplificados e sequenciamento.

O fragmento amplificado que apresentou o tamanho esperado (aproximadamente 1500 pb) foi cortado do gel de agarose a 1% e purificado com o kit *illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare®) seguindo as recomendações do fabricante. Posteriormente, foi quantificado em gel de agarose a 1% em comparação ao High DNA Mass Ladder (Invitrogen®).

O DNA purificado foi então submetido ao sequenciamento. Para tanto foi utilizado o BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) e o aparelho de sequenciamento automático ABI 3500 (Applied Biosystems), conforme recomendações do fabricante, com os primers 1-F e 1-R descritos na Tabela 1. As análises foram feitas no programa Sequence Scanner v1.0 (Applied Biosystems) e Mega 5.1.

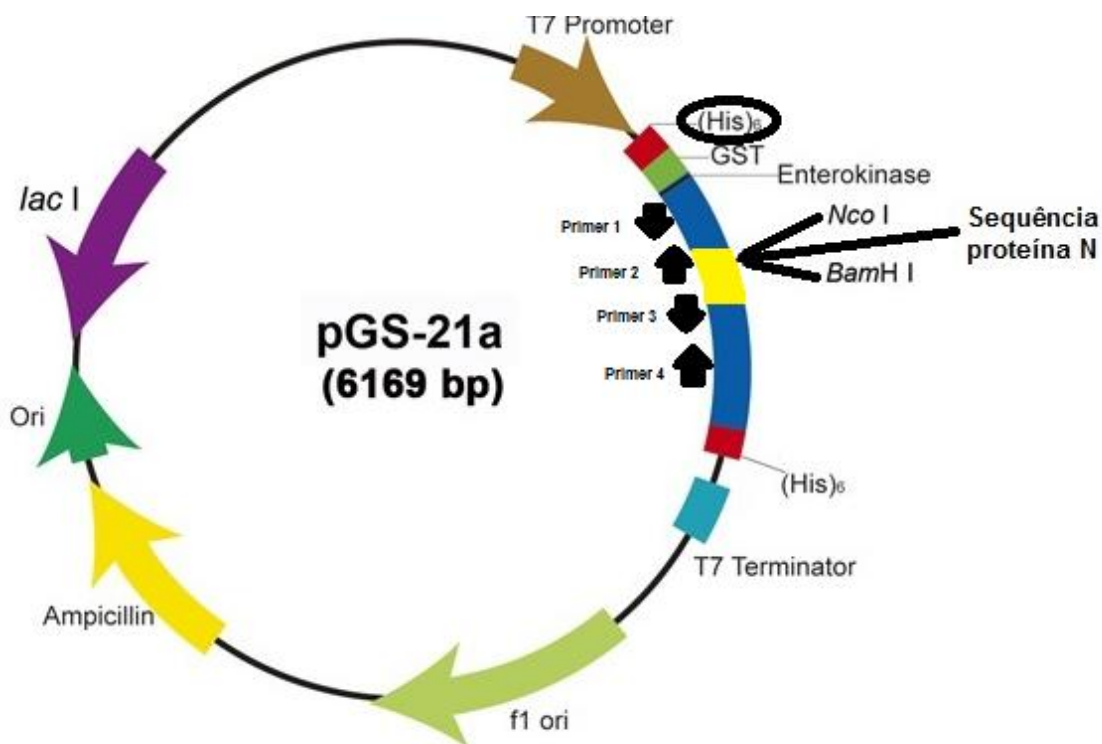
#### 4.3.3. Aquisição do plasmídeo de expressão pGS21a.

Com o resultado do sequenciamento, após as análises, a sequência obtida de 1131 bp foi comparada com outras sequências já depositadas no Genbank. Foram avaliadas as melhores condições para otimização e solicitada a síntese do gene completo contendo 1131 pb no vetor pUC 57 e a subclonagem no vetor de expressão pGS21a, ambos da empresa GenScript.

O vetor pGS-21a foi preparado para clonagem, com expressão de alto nível e para uma fácil purificação de proteínas, através das duas sequências de seis histidinas (6xHis) e da proteína de fusão GST que estão na sequência deste vetor. A primeira sequência de 6xHis está fundida com a GST, e essa fusão de 6xHis-GST pode ser

clivada utilizando a enzima enteroquinase. A segunda sequência de 6xHis pode ser utilizada para detecção e posterior purificação após a clivagem de 6xHis-GST.

O fragmento desejado foi solicitado entre os sítios de clonagem NcoI e BamHI, com a cauda de histidina na porção amino-terminal (Figura 3).



**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.

#### 4.3.4. Propagação do plasmídeo pGS21a/proteína N, reação de digestão e novo sequenciamento.

O plasmídeo de expressão pGS21a contendo a sequência otimizada da proteína N foi inserido na bactéria competente *E.coli* cepa DH5-*a* através da transformação físico-química por choque térmico, descrita por SAMBROOK *et al.*, 1989. A bactéria contendo o plasmídeo pGS21a/proteína N foi semeada em meio Luria-Bertani (LB) Agar (1% tripton, 0,5% extrato de levedura, 17 mM NaCl, 1,5% de ágar bacteriológico) contendo 100µg/mL de ampicilina e incubada a 37°C por 16 horas.

Após este período, foi observado o crescimento de colônias brancas na placa, e algumas destas colônias foram selecionadas e adicionadas em tudo falcon de 15 mL contendo 5 mL de meio LB líquido com 100µg/mL de ampicilina, e incubada sob agitação de 200 rpm, a 37°C, por 16 horas. Em seguida, foi realizada extração plasmidial com o kit QIAprep Spin Miniprep Kit® (Qiagen) seguindo as recomendações do fabricante.

Esse DNA plasmidial extraído foi introduzido na bactéria competente *E.coli* cepa BL21 (DE) também através de transformação físico-química, seguindo o mesmo protocolo descrito acima. Duas colônias isoladas foram submetidas à multiplicação em meio LB, contendo 100 µg/mL de Ampicilina, mantidas sob agitação de 220 rpm, a 37°C, por 16 horas. A extração plasmidial novamente foi realizada com o kit QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen), e a quantificação feita no NanoDrop 1000 (Thermo Scientific). Ao final de cada etapa, uma fração de 900 µL da cultura com 10% de glicerol foi armazenada a -70°C para posterior uso.

Uma reação de digestão foi realizada com o DNA plasmidial extraído da bactéria *E.coli* cepa BL21 (DE) para confirmar o tamanho do fragmento esperado. Foram feitas análises para a escolha do tampão a ser usado (Tango 1x), e as enzimas utilizadas foram NcoI (New England Biolabs®) e BamHI (Fermentas®). A reação foi realizada com incubação a 37°C, por 2 horas, seguindo as recomendações do fabricante. Após a reação, os produtos digeridos foram analisados em gel de agarose a 1% corado com SYBR® Safe DNA gel Stain (Invitrogen®).

Para a realização das reações de sequenciamento, foi necessária a síntese de quatro novos primers (Tabela 2), que foram desenhados no programa *Primer Blast*, utilizando a sequência otimizada pela empresa GenScript, para a confirmação da presença da sequência codificante da proteína N do FCoV. O primer FCoV-1 hibridiza com a terminação 5' da região do plasmídeo próxima a enteroquinase; enquanto o primer FCoV-2 hibridiza a com a terminação 3' da região interna da proteína N; amplificando um produto de 633 pb. O primer FCoV-3 hibridiza com a terminação 5' da região interna da proteína N; enquanto o primer FCoV-4 hibridiza com a terminação 3' da região do plasmídeo próxima a histidina carboxi-terminal; amplificando um produto de 580 pb. A localização da hibridização dos primers pode ser observada na Figura 3.

Foi realizado um novo sequenciamento, com os primers FCoV 1-2-3-4 (Tabela 2), para confirmar a presença da sequência inserida, a orientação correta do fragmento e

verificar a fase de leitura de tradução da proteína a ser produzida. Para tanto foi utilizado o BigDye<sup>®</sup> Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) e o aparelho de sequenciamento automático ABI 3500 (Applied Biosystems), conforme recomendação do fabricante. As análises foram feitas no programa Sequence Scanner v1.0 (Applied Biosystems) e Mega 5.1.

**TABELA 2:** Primers utilizados para o sequenciamento.

| Primer        | Sequência                        | Tamanho |
|---------------|----------------------------------|---------|
| <b>FCoV-1</b> | 5' GAT CTG GTA CCG ACG ACG AC 3' | 633 pb  |
| <b>FCoV-2</b> | 3' GTT AGA TTG CTG GCG CAC AC 5' |         |
| <b>FCoV-3</b> | 5' AAA CGC GTG ATA CCG CAC CG 3' | 580 pb  |
| <b>FCoV-4</b> | 3' TCA GCT TCC TTT CGG GCT TT 5' |         |

#### 4.3.5. Expressão e produção da proteína recombinante

Para a etapa de expressão foram realizados testes prévios para determinar a concentração ideal de IPTG a ser utilizada, o tempo de incubação após a indução e a solubilidade da proteína produzida. Através destes resultados, iniciou-se a etapa de expressão e produção.

Algumas colônias isoladas do pGS-21a/proteína N em *E.coli* cepa BL21 (DE) foram usadas como inóculo para a preparação de 100 mL de meio LB líquido contendo 100 µg/mL de Ampicilina e após este procedimento, o volume preparado foi incubado overnight, a 37°C, sob agitação de 200 rpm. Uma alíquota de 50 mL dessa cultura foi transferida para 450 mL de meio LB líquido com 100 µg/mL de Ampicilina, e deixada sob agitação a 200 rpm a 37°C até atingir A<sub>600</sub> de 0,5-1,0. Após, a cultura foi induzida com IPTG na concentração de 1,0 mmol/L e incubada a 30°C, a 200 rpm, por 4 horas (previamente determinados). Toda a cultura foi centrifugada a 3000 g, durante 15 minutos, a 4°C. O meio foi descartado e o pellet foi lavado 2 vezes em PBS (15 mL por vez, centrifugado a 3000 g, por 15 minutos, a 4°C).

Para a etapa de lise, as células bacterianas foram ressuspensas no tampão 20 mmol/L de fosfato de sódio pH 7,4, 500 mmol/L de NaCl, 20 mmol/L de Imidazol e 1 mg/mL de lisozima a 1/10 do volume da cultura, juntamente com Protease Inhibitor

Mix HP® (SERVA Electrophoresis) na concentração recomendada pelo fabricante. Em seguida as culturas foram incubadas no gelo por 15 minutos e submetida à lise por sonicação por 6 vezes (amplitude de 40%, 4°C por 30 segundos e intervalo de 1 minuto). Foi realizada a centrifugação a 3000 g, durante 15 minutos, a 4°C. O sobrenadante (fração solúvel) foi coletado e o pellet (fração insolúvel) congelado para posterior uso. Ao final, a análise foi realizada pela técnica de SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970), com gel de separação de 10% e coloração com Coomassie Blue.

#### **4.3.6. Purificação da proteína recombinante e quantificação**

A purificação da proteína recombinante presente na fração solúvel foi realizada com a coluna His Trap™ HP (GE Healthcare Life Science), que separa as proteínas de interesse por cromatografia de afinidade. O metal imobilizado (níquel), presente na coluna, tem afinidade pela cauda de histidina (6xHIs) presente na porção amino-terminal da proteína de interesse.

A purificação foi realizada conforme orientação do fabricante. Como solução de ligação e lavagem foi utilizado o tampão 20 mmol/L de fosfato de sódio pH 7,4, 500 mmol/L de NaCl e 20 mmol/L de imidazol; e como solução de eluição foi utilizada a concentração de 500 mmol/L de Imidazol no mesmo tampão descrito para ligação e lavagem, com auxílio em todas as etapas da bomba peristáltica.

Alíquotas de 1 mL das frações eluídas foram coletadas, e estas foram analisadas por espectrofotometria nos comprimentos de onda 260 e 280 nm utilizando o NanoDrop 1000 (Thermo Scientific), para observar o momento em que ocorreu o pico de saída de proteína. Algumas frações foram selecionadas e analisadas pela técnica de SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970), com gel de separação de 10% e coloração com Coomassie Blue.

Após determinar as frações que possuíam a proteína recombinante, a concentração foi estimada pelo método de BCA (SMITH *et.al.*, 1985) em comparação à curva padrão de concentração de albumina sérica bovina (BSA).

#### **4.3.7. Diálise em membrana de celulose**

As alíquotas purificadas que continham a proteína foram unidas em um único tubo e submetidas à diálise, em duas etapas, em membrana de celulose (33 mm, 12 kDa -

Sigma Aldrich) para remoção do imidazol. Na 1ª etapa, foi utilizado o tampão 20 mmol/L de fosfato de sódio pH 7,4, 500 mmol/L de NaCl e 200 mmol/L de Imidazol, durante 24 horas, com três trocas de tampão. Na 2ª etapa, foi utilizado o tampão 20 mmol/L de fosfato de sódio pH 7,4 e 500 mmol/L de NaCl, durante 24 horas, com três trocas de tampão. Todo o procedimento foi realizado em câmara fria, a 4°C, sob agitação. Após este período, a amostra total foi recuperada em alíquotas de 0,5mL e acondicionadas em microtubos de 1,5 mL livres de nucleases (Axygen®), sendo mantida sob refrigeração (4°C) até o momento do seu uso.

Uma nova etapa de quantificação foi realizada, na qual a concentração foi novamente estimada pelo método de BCA (SMITH *et.al.*, 1985) em comparação à curva padrão de concentração de albumina sérica bovina (BSA). Foi realizada também a quantificação no equipamento NanoDrop 1000® (Thermo Scientific), no comprimento de onda 280 nm, para comparação entre os métodos.

#### **4.3.8. Reação enzimática com enteroquinase (EK)**

Para a clivagem da proteína de fusão GST, presente na sequência traduzida da proteína N, foi realizada uma reação de digestão com a enzima enteroquinase (GenScript Corporation). Uma unidade (1u) da enzima é definida como a quantidade de enzima necessária para clivar 95% de 50 µg de proteína de fusão em 16 horas a 22°C em um tampão contendo Tris-HCl 25 mM pH 8,0.

Testes com diferentes diluições e temperaturas foram feitos, seguindo as recomendações do fabricante, para otimizar essa reação enzimática, visando um alto rendimento final. Foram testadas as seguintes diluições da enzima 1u, 0,1u; 0,01u; 0,001u; 0,0001u; 0,00001u; 0,000001u para determinar a concentração ideal de EK por reação. A incubação inicial foi feita a 22°C por 16 horas. Em seguida, foram realizados testes, onde a concentração da enzima por reação já estava definida, com diferentes temperaturas de 18°C, 20°C, 22°C, 24°C e 28°C, e incubadas por 16 horas.

Após cada reação, foi adicionado Protease Inhibitor Mix HP (SERVA Electrophoresis) na concentração recomendada pelo fabricante para a inativação da EK. As análises foram feitas pela técnica de SDS-PAGE com gel de separação de 10%.

#### 4.3.9. Western e Dot Blotting

As amostras submetidas à reação com a EK foram analisadas pelo Western e Dot Blotting para verificação da especificidade das frações obtidas. Para o Western Blotting, foi realizada a SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970) em duplicata e após a transferência em membrana de nitrocelulose (porosidade 0,22  $\mu\text{m}$  - Protran<sup>TM</sup> – Whatman) no aparelho Trans-Blot SD Smi-dry Transfer Cell (Bio Rad®), seguindo as recomendações do fabricante. A transferência foi realizada a 15 V, por 60 minutos e como tampão foi usado o Bjerrum and Schafer-Nielsen (48 mmol/L Tris; 39 mmol/L Glicina; 20% metanol; 3,35 mL de SDS a 10%, pH 9.2). Após a transferência, a membrana foi corada em solução de Ponceau S (0,1% Ponceau e 5% Ácido acético glacial) por 10 minutos e descorada com água Mili-Q até a total eliminação da coloração avermelhada presente na membrana. O gel também foi corado com Coomassie Blue para verificação da eficiência da transferência.

No Dot Blotting, o antígeno puro (1 $\mu\text{L}$ ) foi adicionado em duplicata diretamente nas tiras de membrana de nitrocelulose (porosidade 0,22  $\mu\text{m}$  - Protran<sup>TM</sup> – Whatman). Nas tiras A, B, C, D e E foi adicionado o antígeno total (proteína N + GST clivadas e frações de tamanhos inespecíficos, que são pertencentes a bactéria *E.coli* cepa BL21 (DE)); e nas tiras F, G, H e I foi adicionado o antígeno que continha a fração da GST e as mesmas frações de tamanhos inespecíficos.

As etapas seguintes foram realizadas para as duas técnicas descritas.

As membranas foram bloqueadas *overnight* com TBS (Tris Buffered Saline – 10 mmol/L de Tris-HCl pH 7.4 e 150 mmol/L de NaCl) contendo 10% de leite em pó desnatado (LPD). Em seguida, foram realizadas 3 lavagens de 10 minutos com TBS para remoção do bloqueio e foi adicionado o anticorpo primário diluído em TBS contendo 10% de LPD incubado por 2 horas sob agitação. Após a incubação, foram realizadas duas lavagens de 10 minutos com TBS e adicionado o anticorpo secundário diluído em TBS contendo 10% de LPD, incubado por 2 horas sob agitação. Ao final, três lavagens de 10 minutos foram feitas com TBS e a solução de substrato cromógeno (50 mL de TBS, 10 mL de metanol, 1 mL de cloronaftol (a 30 mg/mL diluído em metanol), e 30  $\mu\text{L}$  de peróxido de hidrogênio) foi adicionada na membrana e incubada por 10 a 30 minutos sob agitação suave. A reação foi bloqueada com três lavagens de 10

minutos com água ultra-pura sob agitação. Todas as etapas foram realizadas a temperatura ambiente.

Como anticorpo primário para a marcação do fragmento correspondente ao tamanho da proteína N, foi utilizado soro de gato (diluição 1/100) positivo para FCoV (testado pelo kit ImmunoComb FCoV) e como anticorpo secundário o conjugado de coelho Anti-IgG de gato marcado com peroxidase (diluição 1/200). Já para a marcação do fragmento correspondente ao tamanho da proteína de fusão GST, foi utilizado como anticorpo primário o anticorpo sintético anti-GST (diluição 1/1000), e como anticorpo secundário o conjugado protein G peroxidase (diluição 1/1000).

#### **4.3.10. Separação das frações da proteína pós-reação com EK**

Após à reação com a EK, as amostras foram submetidas a testes para separação das frações obtidas (Proteína N do FCoV 42 kDa, GST 29 kDa e Proteína N+GST=72 kDa), através do uso de colunas de cromatografia de afinidade e da técnica de coluna de gel filtração.

Foram utilizadas duas colunas com diferentes protocolos, His Trap<sup>TM</sup> HP e GSTrap HP (ambas da GE Healthcare Life Science), seguindo as recomendações do fabricante. Para a coluna His Trap<sup>TM</sup> HP, foi seguido o mesmo protocolo descrito no item 4.3.6, com mudança na concentração do Imidazol no tampão de eluição, onde foi realizado um gradiente nas concentrações de 40, 50, 80, 100 e 150 mM. Para a coluna GSTrap HP, como tampão de ligação e lavagem foi utilizado o tampão PBS pH 7,3; e como tampão de eluição 50 mM de Tris-HCl pH 8,0 e 20 mM de glutathione reduzida. Para os dois protocolos, alíquotas de 0,5 mL foram colhidas na etapa de aplicação da amostra, de lavagem da coluna e de eluição.

Para a gel filtração, foram utilizadas as colunas Superdex<sup>TM</sup> 75 10/300 GL e Hiprep<sup>TM</sup> 16/60 Sephacry<sup>TM</sup> S-200 HR (ambas da GE Healthcare Life Sciences), com auxílio do aparelho HPLC Akta Purifier (GE Healthcare Life Sciences) seguindo as recomendações do fabricante. Foi utilizado 500 µL de amostra da proteína, a uma concentração de 2,0 ng/mL. A amostra estava no tampão 500 mmol/L de NaCl e 20 mmol/L de fosfato de sódio, pH 7,4 e, o mesmo tampão foi utilizado no procedimento. Foram colhidas alíquotas de 0,5 mL na etapa de eluição.

Todas as análises foram feitas através da técnica de SDS-PAGE com gel de separação de 10% e coloração com Coomassie Blue.

#### **4.3.11. Elisa Indireto**

##### **4.3.11.1. Determinação da concentração do antígeno e diluição dos soros**

Testes foram feitos para determinar a concentração ideal de antígeno a ser utilizado na etapa de adsorção. Foram testadas as concentrações de 50, 100, 150 e 200 ng/poço de antígeno. Juntamente foram realizados testes com as diluições de soro 1/50, 1/100, 1/200 e 1/400. Para calcular qual a melhor concentração de antígeno e diluição dos soros que deveria ser utilizada, foi calculada uma razão entre a absorbância do controle positivo e do controle negativo.

##### **4.3.11.2. Teste de interferência da GST**

Foram realizados testes com quatro amostras de soros diferentes (diluição 1/50), sendo duas positivas (denominadas P1 e P2) e duas negativas (denominadas N1 e N2), utilizando o kit ImmunoComb FCoV (FIP), para avaliar a interferência da concentração de GST nos resultados de ELISA. Em cada poço da placa foi adicionada a concentração de antígeno total (proteína N + GST clivadas) determinada no item 4.3.11.1, adicionado de 50 ou 100 ng/poço de GST (frações únicas obtidas pelas purificações), além do controle onde foi adicionada apenas a fração da GST na concentração de 50 ng.

##### **4.3.11.3. Processamento das amostras**

Cento e cinquenta e uma amostras de soros de gatos foram testadas. As amostras foram processadas em microplacas de ELISA de fundo plano e rígido (Nunc - Maxisorp<sup>®</sup>) com 96 cavidades. A adsorção foi feita com 50 ng/poço (previamente determinado) do antígeno diluído em tampão carbonato-bicarbonato (TCB) pH 9,6 e adicionado 100 µL/poço. As placas foram incubadas durante 16 a 17 horas, a 4 °C, em câmara úmida para a adsorção. As amostras foram testadas todas em duplicata. Com o

término da incubação, a placa foi lavada cinco vezes com PBST pH 7,4. Estas lavagens ocorreram entre todas as etapas seguintes.

Para a fase de bloqueio foi utilizado o LPD a 10%, diluído em TCB pH 9,6 sendo adicionado 300 µL/poço, e mantido durante 1 hora em câmara úmida a 37°C. Os soros dos gatos foram diluídos 1/200 (previamente determinado) com PBST e LPD 10%, sendo adicionado 100 µL/poço, e incubado durante 1 hora em câmara úmida a 37°C. O conjugado IgG de coelho anti-IgG de gato marcado com peroxidase foi diluído 1/1000 (previamente determinado) em PBST e LPD 10%, sendo adicionado 100 µL/poço, e incubado durante 1 hora em câmara úmida a 37°C.

Na etapa seguinte, foi adicionada 100 µL/poço da solução de substrato cromógeno, contendo 10 mL de tampão citrato acetato (pH 6,0), 100 µL de TMB (10 mg/mL diluído em DMSO) e 2,5 µL de peróxido de hidrogênio a 30%. Após 15 minutos de incubação sob agitação suave em temperatura ambiente, a reação enzimática foi bloqueada pela adição de 50 µL/poço de HCl a 2 mol/L.

A leitura das microplacas foi realizada em um leitor de ELISA (Multiskan EX – Labsystems) a um comprimento de onda de 450 nm. Dos resultados foi subtraído o branco onde foram adicionados apenas os reagentes das etapas de bloqueio e substrato.

#### **4.3.11.4. Análises do ELISA**

Todas as amostras foram testadas em duplicata, e os resultados foram reportados como  $A_{450}$ . Inicialmente, o valor do branco (onde foram adicionados os reagentes das etapas de bloqueio, substrato cromógeno e bloqueador enzimático) foi subtraído de cada resultado, e em seguida foi calculada a média das duplicatas. Para correções de possíveis variações dos valores das D.O.s obtidas, foi calculada a relação S/P (índice ELISA), baseada na fórmula  $(\text{Média da } A_{450} \text{ da amostra} - \text{Média da } A_{450} \text{ do controle negativo}) / (\text{Média da } A_{450} \text{ do controle positivo} - \text{Média da } A_{450} \text{ do controle negativo})$ .

O ImmunoComb FCoV (FIP) foi o teste de referência utilizado para auxiliar no cálculo do ponto de corte (“cut-off”) do ELISA. Foi calculada a média aritmética da  $A_{450}$  de 53 amostras negativas (testadas pelo kit e pelo ELISA), mais 4 desvios padrão. Utilizando este ponto de corte, os dados resultantes categóricos (amostras negativas e positivas) do ELISA foram tabulados em tabela de contingência com os resultados do ImmunoComb FCoV (FIP), utilizando o programa Microsoft Office Excel 2007. A

sensibilidade, especificidade e acurácia relativa do ELISA em relação ao ImmunoComb FCoV (FIP) foram determinados por cálculos padrão.

#### **4.4. Estudo soroepidemiológico**

##### **4.4.1. Animais e amostras**

Todos os animais do estudo (n=151) eram domiciliados e residentes na cidade de Botucatu, Estado de São Paulo, Brasil. O n do trabalho foi calculado utilizando dados do número estimado de gatos da cidade de Botucatu no ano de 2014 (Instituto Pasteur, 2014) e dados mundiais da literatura referentes a soropositividade para FCoV, já que não há dados nacionais disponíveis (HERREWEGH *et al.*, 1995; ADDIE e JARRETT, 2006; BROWN *et al.*, 2009; PEDERSEN, 2009).

Amostras com o volume de 0,5 a 1 mL de sangue foram colhidas assepticamente por meio de punção da veia cefálica ou jugular, e acondicionadas em tubo de vidro siliconizado contendo gel ativador de coágulo (Vacutainer®, Becton Dickinson) para obtenção do soro sanguíneo. Estas amostras foram centrifugadas a 4.000g durante 10 minutos e os soros obtidos foram armazenados em microtubos de 1,5 mL livres de nucleases (Axygen®) e congelados a -20°C até o momento de uso. Dados individuais de cada animal, tais como, idade e/ou faixa etária (filhote, jovem, adulto, senil), raça, gênero, condição reprodutiva (inteiro ou castrado), acesso à rua (sim ou não), modo de criação (em grupo ou solitário), foram obtidos e anotados em uma ficha epidemiológica.

##### **4.4.2. Teste sorológico**

Os soros foram testados pelo kit ImmunoComb FCoV (FIP)® (Biogal Galed Labs. Acs. Ltd.) para detecção de anticorpos IgG anti-FCoV, seguindo as recomendações do fabricante. A leitura foi realizada através de escaneamento, utilizando o software CombScan e pelo método manual indicado no kit, classificando os animais como soropositivos ou soronegativos.

#### **4.4.3. Análises estatísticas**

Foram utilizados os programas Statistical Analysis System (SAS 9.3) e Microsoft Office Excel 2007 para as análises do estudo. Todas as variáveis foram analisadas por métodos de estatística descritiva, apresentando-se a frequência e porcentagem.

Para verificar a existência de diferenças estatísticas entre os grupos de cada variável quanto à soropositividade ("0" se a soropositividade foi ausente e "1" se a soropositividade foi presente) foram utilizados modelos de regressão logística, com significância estatística determinada para p-valores menores ou iguais a 0,05. A significância estatística da diferença foi determinada quando o valor 1 não estava incluído no intervalo de 95% de confiança.

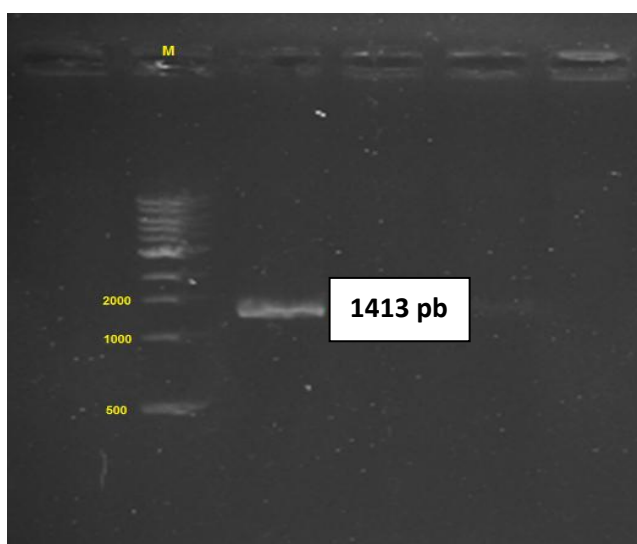
## 5. RESULTADOS

### 5.1. Produção do antígeno recombinante e ELISA indireto

#### 5.1.1. Amplificação do fragmento que codifica a proteína N do FCoV e primeiro sequenciamento.

Na Figura 4 é possível visualizar um fragmento único de aproximadamente 1413 pb no gel de agarose a 1% após amplificação pela RT-PCR do fragmento que codifica a proteína N do FCoV.

Com o resultado do sequenciamento foi obtida uma sequência de 1.131 bp e 376 aminoácidos (do *start* ao *stop* códon) que foi depositada no GenBank (acesso AGT45943.1). Essa sequência de nucleotídeos foi comparada e apresentou 91% de identidade com sequências já conhecidas e depositadas (GU017093.1; GU017096.1; HQ012371.1). A identidade em relação à sequência de aminoácidos codificada foi de 89% (AAY32599.1; ACT10860.1; ADC34648.1).



**FIGURA 4.** Gel de agarose a 1% após RT-PCR. Presença de fragmento de aproximadamente 1413 pb.

### **5.1.2. Propagação do plasmídeo pGS21a/proteína N, reação de digestão e novo sequenciamento.**

Inicialmente o plasmídeo pGS21a/proteína N foi inserido diretamente na bactéria de expressão *E.coli* cepa BL21 (DE), e não houve crescimento de nenhuma colônia. Após este resultado negativo, o mesmo plasmídeo foi inserido primeiramente na bactéria *E.coli* cepa DH5 $\alpha$  e, após o crescimento das colônias, o DNA plasmidial foi extraído e assim, inserido na bactéria *E.coli* cepa BL21 (DE), apresentando crescimento bacteriano desta vez.

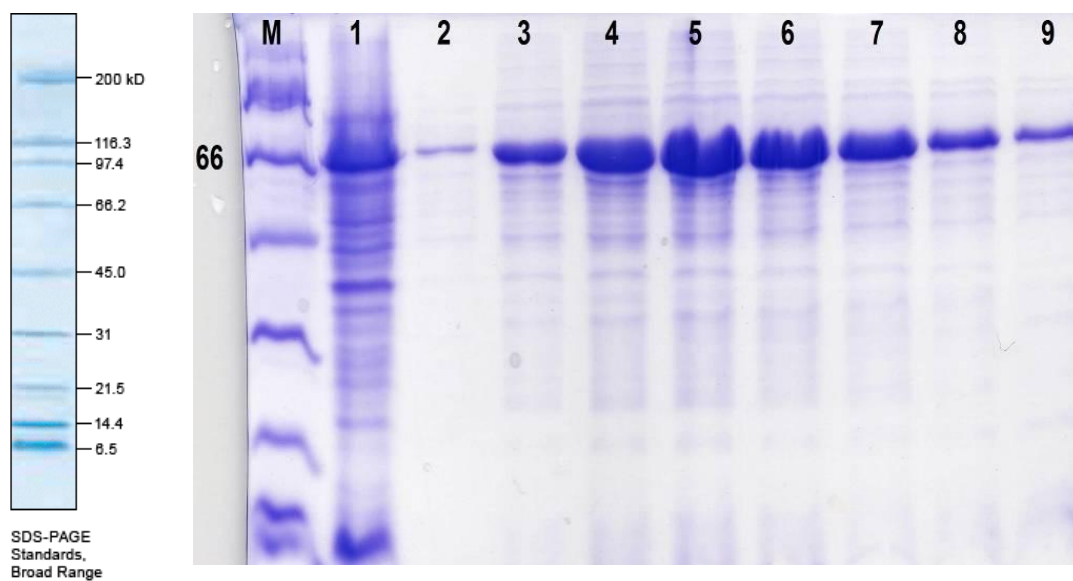
Através da reação de digestão, onde foi utilizado amostra do DNA plasmidial propagado na bactéria *E.coli* cepa BL21 (DE), foi observado um fragmento que correspondia ao tamanho esperado de 1131 pb, confirmando a presença da sequência inserida no plasmídeo pGS21a. Com as quatro reações de sequenciamento realizadas (primers Tabela 2), foi possível obter o contig da sequência completa da proteína N do FCoV, e assim pode-se ter mais uma confirmação da presença da sequência inserida no plasmídeo, e também foi possível ver a orientação correta do fragmento e a fase de leitura de tradução da proteína a ser produzida.

### **5.1.3. Expressão da proteína recombinante**

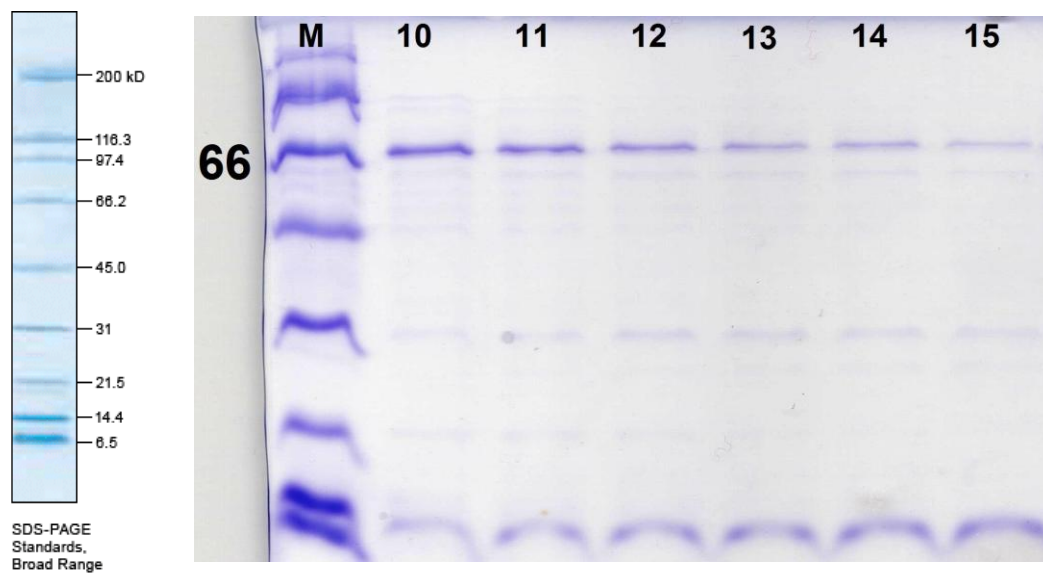
Para os testes de expressão, a concentração ideal determinada de IPTG foi de 1 mmol/L, e o tempo de indução de 4 horas. Com estes parâmetros estabelecidos, a proteína traduzida se encontrava tanto na fração solúvel (em maior quantidade), como na fração insolúvel.

### **5.1.4. Purificação da proteína recombinante**

Nas Figuras 5 e 6, é possível a visualização nas alíquotas 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13,14 e 15 colhidas após a purificação dos fragmentos de aproximadamente 72 kDa (proteína N + GST) , correspondentes ao tamanho da proteína traduzida. Na alíquota 1, está a amostra sem purificar, mostrando também a presença do fragmento de 72 kDa. Nas duas Figuras é possível visualizar a presença de bandas inespecíficas, devido ao uso da alta concentração de imidazol na etapa de eluição da proteína.



**FIGURA 5.** SDS-PAGE após purificação na coluna His Trap<sup>TM</sup> 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.



**FIGURA 6.** SDS-PAGE após purificação na coluna His Trap<sup>TM</sup> 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.

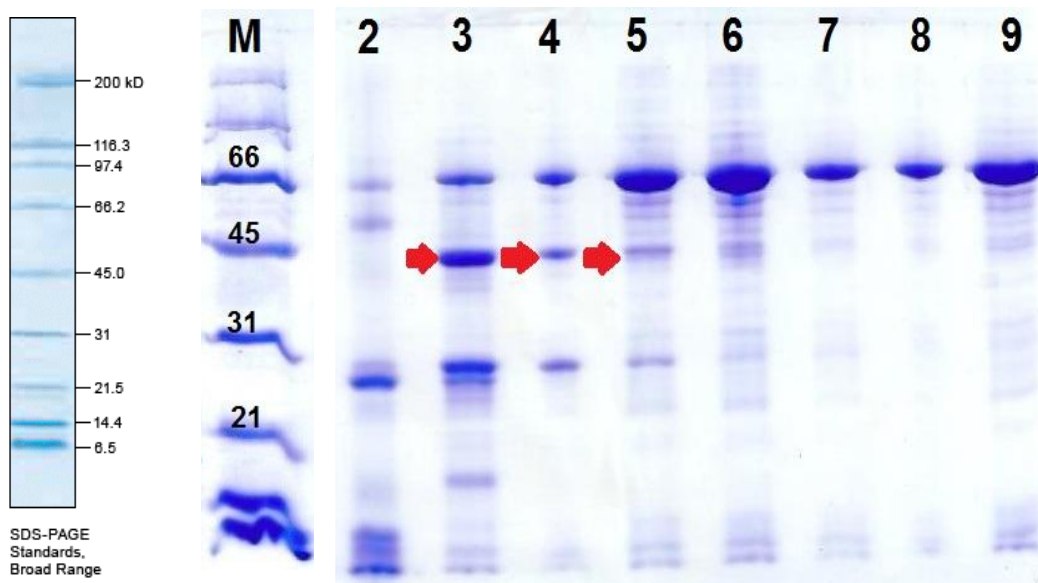
### 5.1.5. Diálise em membrana de celulose

Para manter a estabilidade da amostra sem precipitação, algumas etapas realizadas foram fundamentais. O procedimento foi realizado todo a 4°C e em duas etapas, onde a concentração de imidazol foi sendo reduzida gradualmente. Ao final da diálise, a amostra total ao ser recuperada da membrana, precisou ser dividida em alíquotas de 0,5 mL ao invés de ser armazenada em um único tubo de 15 mL.

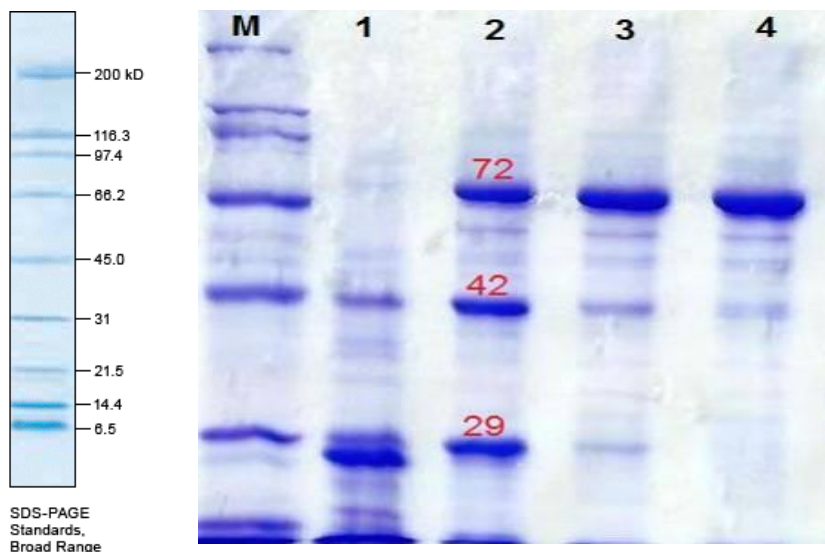
### 5.1.6. Reação enzimática com a EK

A concentração de 0,1 u por reação (para cada 50 µg de proteína) foi a que apresentou melhores resultados de rendimento (Figura 7).

Na Figura 8, onde foram feitos testes com as diluições de 1 u (1); 0,1 u (2); 0,01 u (3); e 0,001 u (4), é possível ver as três possíveis frações (poço 2) de 72 kDa (proteína N + GST + cauda de histidina), 42 kDa (proteína N) e 29 kDa (GST), correspondentes aos produtos esperados, com a concentração de 0,1 u na reação.

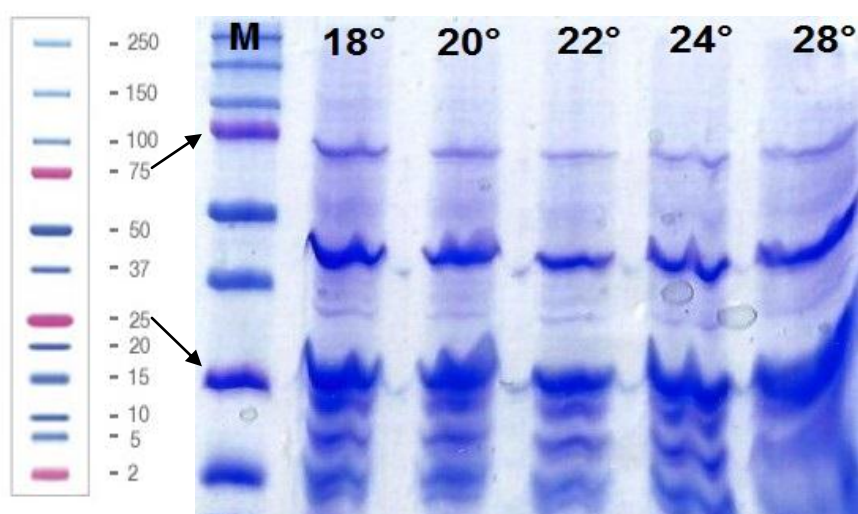


**FIGURA 7.** SDS-PAGE após reação enzimática com EK. M: marcador (Standards/Broad Range – Bio Rad). EK em diferentes concentrações - **2:** 1 u; **3:** 0,1 u; **4:** 0,01 u; **5:** 0,001 u; **6:** 0,0001 u; **7:** 0,00001 u; **8:** 0,000001 u; **9:** 0 u. \* Seta vermelha: frações correspondentes ao tamanho da proteína N do FCoV.



**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.

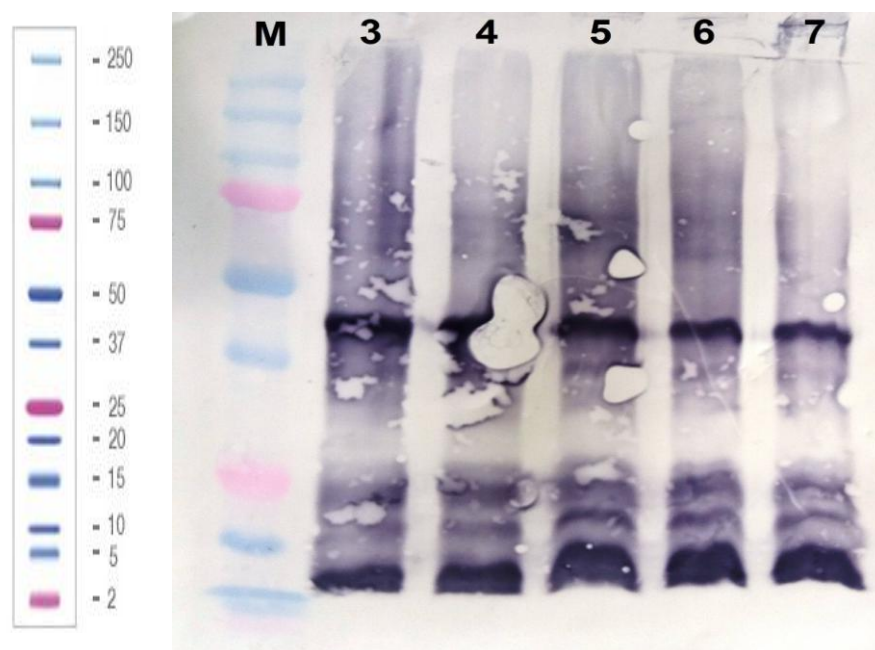
Todas as temperaturas testadas apresentaram resultados satisfatórios na reação. As temperaturas de 18°C e 20°C apresentaram melhores resultados, visualizados no gel de SDS-PAGE. As etapas seguintes foram realizadas com a temperatura de 18°C. Na Figura 9, é possível a visualização das frações de tamanho 72, 42 e 29 kDa nas temperaturas de 18°C, 20°C, 22°C, 24°C e 28°C. Há também a presença de bandas inespecíficas abaixo de 25 kDa.



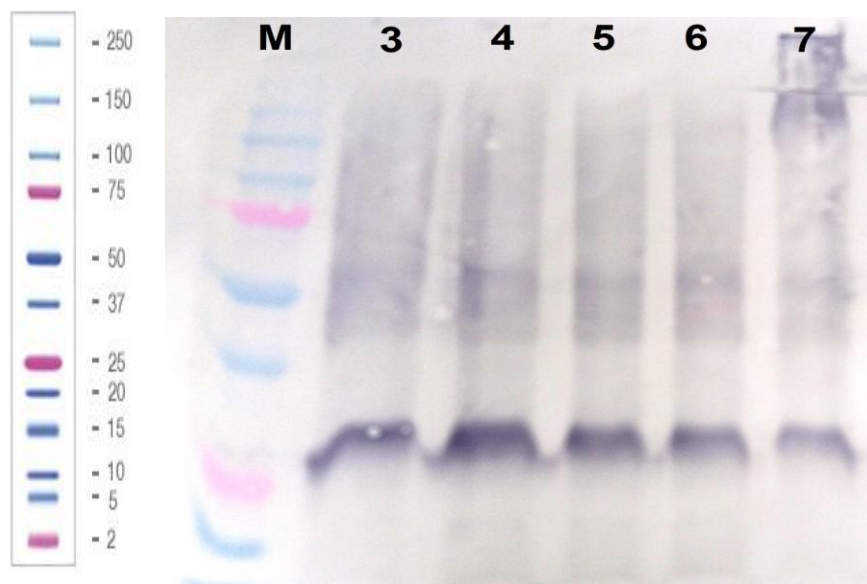
**FIGURA 9.** SDS-PAGE do teste de temperatura para a reação com a EK. M: marcador (Precision Plus Protein™ Standards, Bio Rad). Presença dos fragmentos de 72, 42 e 29 kDa nas temperaturas de 18°C, 20°C, 22°C, 24°C e 28°C.

### 5.1.7. Western e dot blotting

As Figuras 10 e 11 correspondem ao resultado do Western Blotting. A mesma amostra foi utilizada para a transferência das duas membranas. Na Figura 10, foi utilizado o soro de gato positivo (anticorpo primário) e o conjugado de coelho Anti-IgG de gato marcado com peroxidase (anticorpo secundário), sendo possível a visualização evidente da fração marcada de 42 kDa nas amostras 3, 4, 5, 6 e 7. Na Figura 11, foi utilizado o anticorpo sintético anti-GST (primário) e o conjugado protein G peroxidase (anticorpo secundário), sendo possível a visualização do fragmento marcado correspondente ao tamanho da GST (29 kDa) nas amostras 3, 4, 5, 6 e 7.

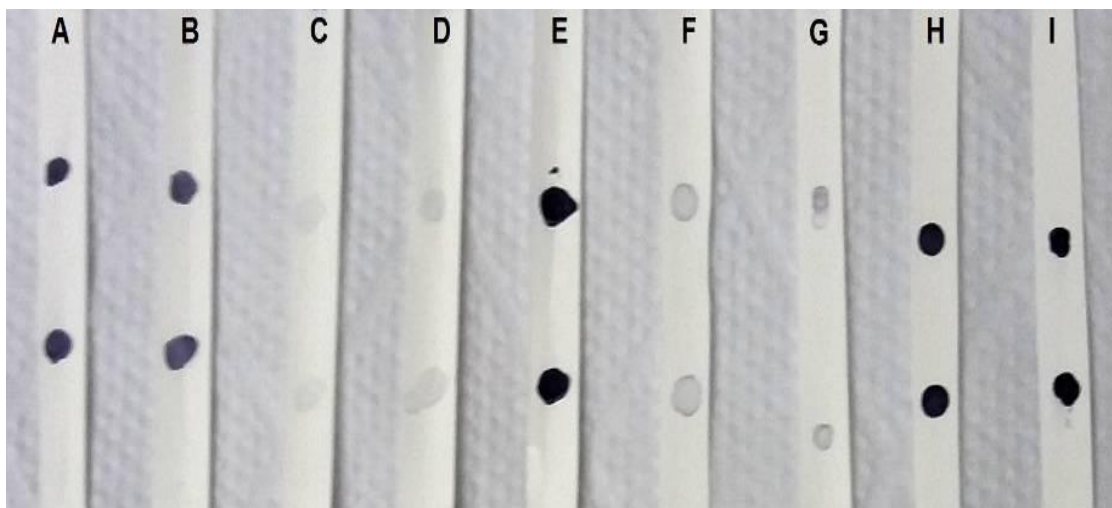


**FIGURA 10.** Western Blotting com uso de anticorpos anti-FCoV. M: marcador (Precision Plus Protein™ Standards, Bio Rad). Marcação evidente da fração de aproximadamente 42 kDa correspondente ao tamanho esperado da proteína N. Marcação de frações inespecíficas da bactéria menores que 20 kDa.



**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.

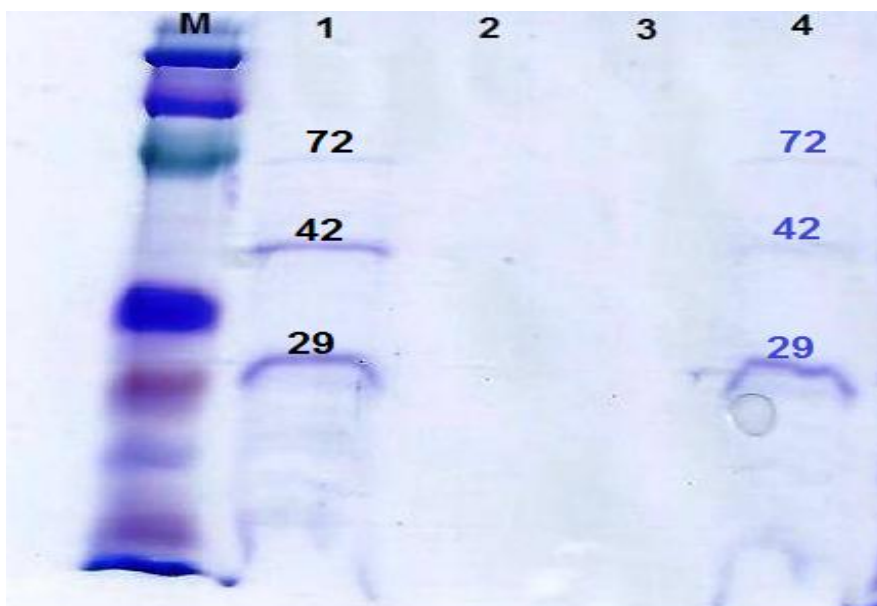
A Figura 12 corresponde ao resultado do Dot Blotting. Na tira A e B, foram utilizados soros de gatos positivos para FCoV (testados pelo kit ImmunoComb FCoV), e pode-se observar marcação evidente. Nas tiras C e D, foram utilizados soros de gatos negativos para FCoV (testados pelo kit ImmunoComb FCoV) e, pode-se observar uma fraca marcação. Na tira E, foi utilizado o anticorpo sintético anti-GST e houve marcação evidente também. Nas tiras F e G foram utilizados um soro positivo e um soro negativo, respectivamente, para FCoV (testados pelo kit ImmunoComb FCoV), e pode-se observar uma fraca marcação. Nas tiras H e I foi utilizado o anticorpo sintético anti-GST, e houve marcação evidente.



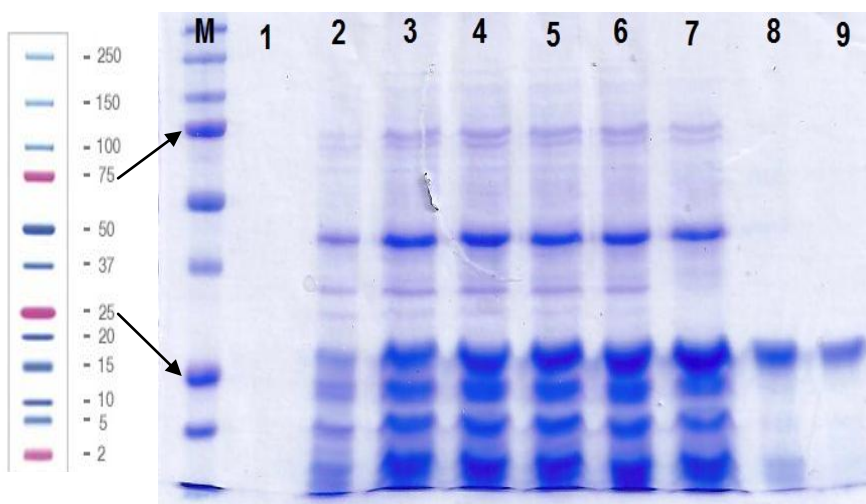
**FIGURA 12.** Dot blotting com uso do **antígeno total (proteína N + GST clivadas)** nas tiras A, B, C, D e E. **Tiras A e B:** marcação forte na fita - Uso de soros positivos para FCoV testados pelo kit ImmunoComb FCoV (FIP); **Tiras C e D:** marcação fraca na fita - Uso de soros negativos para FCoV 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.

#### 5.1.8. Separação das frações da proteína pós-reação com EK

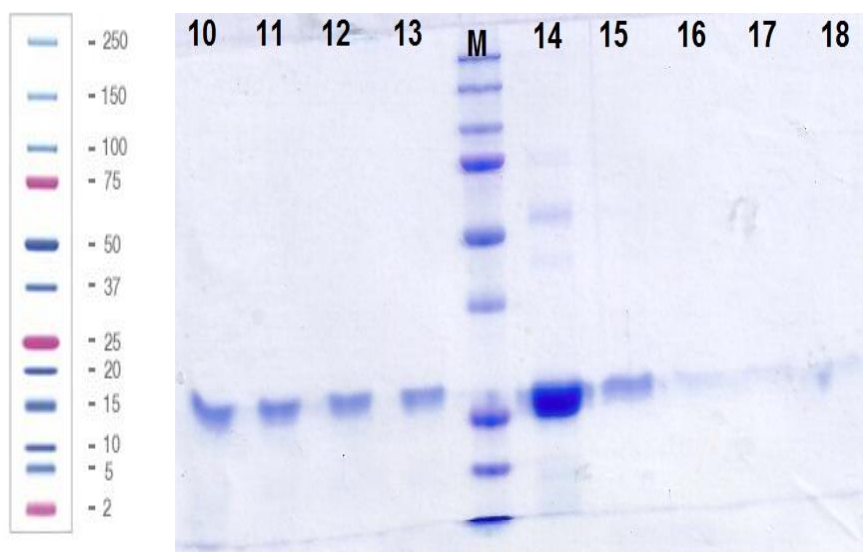
Todos os testes realizados não apresentaram resultados satisfatórios. Tanto pela técnica de colunas de cromatografia de afinidade, como pela técnica de coluna de gel filtração, a fração da proteína N (42 kDa) e da GST (29 kDa) permaneceram juntas na mesma alíquota após os procedimentos (Figuras 13, 14, 15 e 16). Com os testes, foi possível obter alíquotas que continham a proteína N e a GST clivadas e alíquotas que só continham a GST.



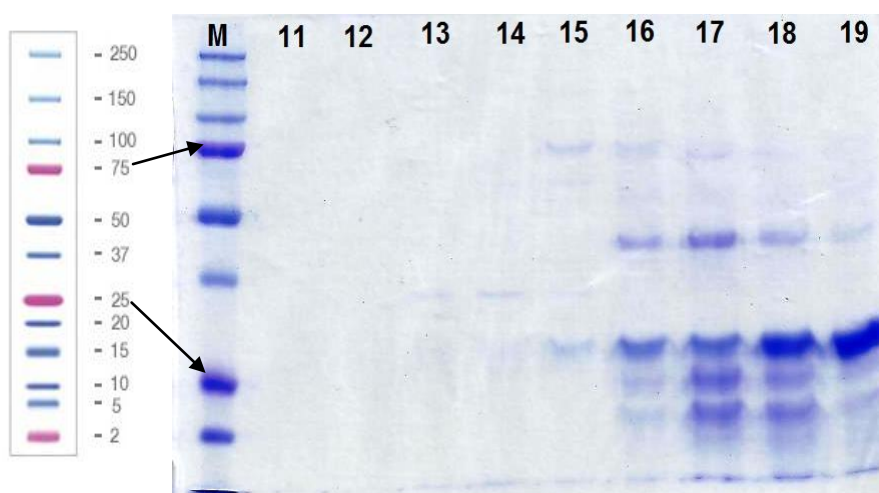
**FIGURA 13.** SDS-PAGE após purificação com a coluna HisTrap™ HP - **M:** marcador. **Amostra 1:** Proteína não passada pela coluna, mostrando as frações de 72, 42 e 29 kDa. **Amostra 2:** Fluxo de passagem no momento da aplicação da amostra total. **Amostra 3:** Lavagem da coluna pós-aplicação da amostra total. **Amostra 4:** Conteúdo da eluição, mostrando as frações de 72, 42 e 29 kDa.



**FIGURA 14.** SDS-PAGE após purificação com a coluna GSTRap 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.



**FIGURA 15.** SDS-PAGE após purificação com a coluna GSTrap 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.



**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.

### 5.1.9. ELISA indireto

#### 5.1.9.1. Determinação da concentração do antígeno e diluição dos soros

A concentração de antígeno definida para a etapa de adsorção foi de 50 ng/poço e a diluição do soro de 1/200. Os resultados estão descritos na Tabela 3.

**TABELA 3.** Testes de concentração de antígeno e diluição de soros (ELISA padronizado)

| [ ] Antígeno | Diluição Soro | Positivo (D.O) | Negativo (D.O) | Razão |
|--------------|---------------|----------------|----------------|-------|
|              |               | $A_{450}$      | $A_{450}$      |       |
| 50 ng        | 1/50          | 1,630          | 0,321          | 5,08  |
|              | 1/100         | 1,353          | 0,261          | 5,18  |
|              | 1/200         | 1,130          | 0,208          | 5,43  |
|              | 1/400         | 0,847          | 0,152          | 5,57  |
| 100 ng       | 1/50          | 1,804          | 0,463          | 3,90  |
|              | 1/100         | 1,631          | 0,412          | 3,96  |
|              | 1/200         | 1,499          | 0,313          | 4,79  |
|              | 1/400         | 1,195          | 0,226          | 5,29  |
| 150 ng       | 1/50          | 1,829          | 0,678          | 2,70  |
|              | 1/100         | 1,642          | 0,513          | 3,20  |
|              | 1/200         | 1,446          | 0,396          | 3,65  |
|              | 1/400         | 1,288          | 0,282          | 4,57  |
| 200 ng       | 1/50          | 1,734          | 0,772          | 2,25  |
|              | 1/100         | 1,622          | 0,621          | 2,61  |
|              | 1/200         | 1,551          | 0,477          | 3,25  |
|              | 1/400         | 1,388          | 0,330          | 4,21  |

#### 5.1.9.2. Teste de interferência da GST

Os resultados estão descritos na Tabela 4. As amostras P1 e P2 apresentaram alta reatividade, porém com variações no valor das D.O. (todas acima de 1,5) nos testes feitos com o antígeno total adicionado das concentrações de 50 e 100 ng de GST. Já para o teste feito só com a GST como antígeno, houve uma baixa reatividade destas amostras. As amostras N1 e N2 apresentaram baixa reatividade, com pequenas variações no valor das D.O. (testes feitos com o antígeno total adicionado das concentrações de 50 e 100 ng de GST). O teste feito só com a GST, mostra também uma baixa reatividade das amostras.

**TABELA 4.** Teste de interferência da GST.

| AMOSTRA   | CONCENTRAÇÃO DE AG |                                     |                                      |                 |
|-----------|--------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|-----------------|
|           | 50 ng de Ag total  | 50 ng de Ag total<br>+ 50 ng de GST | 50 ng de Ag total<br>+ 100 ng de GST | 50 ng de<br>GST |
| <b>P1</b> | 2,004              | 1,696                               | 1,637                                | 0,090           |
| <b>P2</b> | 1,958              | 1,559                               | 1,778                                | 0,125           |
| <b>N1</b> | 0,356              | 0,279                               | 0,267                                | 0,091           |
| <b>N2</b> | 0,104              | 0,087                               | 0,079                                | 0,045           |

Resultado em D.O. ( $A_{450}$ ) Branco da placa: 0.041

### 5.1.9.3. Processamento das amostras e análises do ELISA

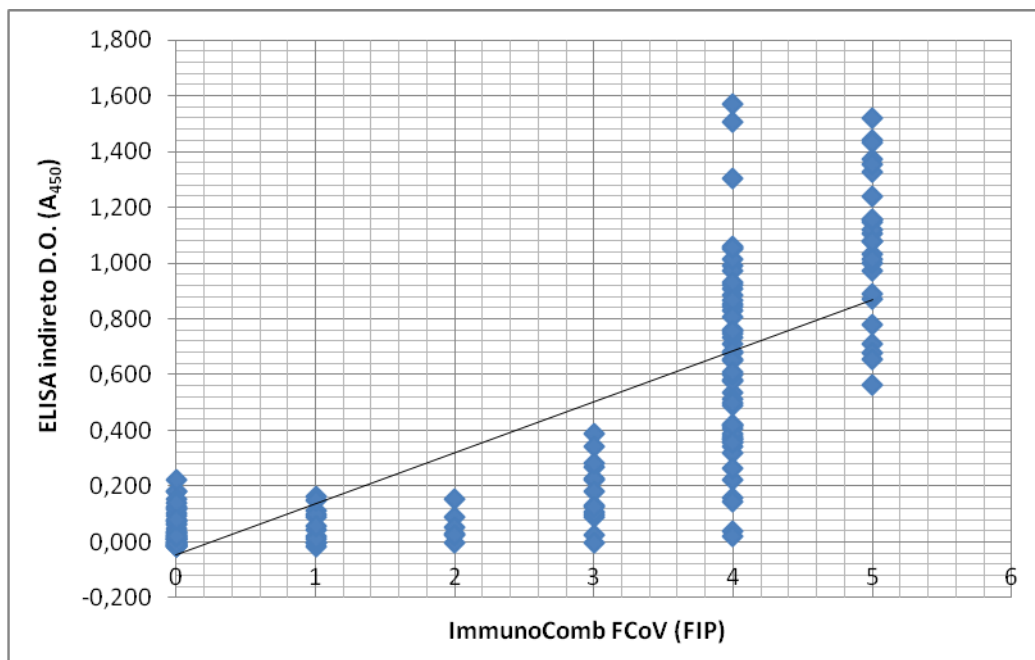
As 151 amostras foram testadas nas mesmas condições pelo ELISA indireto e pelo teste comercial ImmunoComb FCoV (FIP). O ponto de corte estabelecido a partir da média aritmética da  $A_{450}$  de 53 amostras negativas (testadas pelo kit comercial) mais 4 desvios padrão foi de 0,152. Então, definiu-se que: D.O. ( $A_{450}$ ) < ou = a 0,152 - amostra soronegativa; e D.O. ( $A_{450}$ ) > que 0,152 - amostra soropositiva. A sensibilidade, especificidade e acurácia relativa do ELISA indireto estão descritos na Tabela 5.

**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).

| ELISA<br>indireto | ImmunoComb FCoV (FIP) |          |          |              |
|-------------------|-----------------------|----------|----------|--------------|
|                   |                       | <b>P</b> | <b>N</b> | <b>TOTAL</b> |
| <b>P</b>          |                       | 83       | 3        | 86           |
| <b>N</b>          |                       | 14       | 51       | 65           |
| <b>TOTAL</b>      |                       | 97       | 54       | 151          |

- Sensibilidade relativa: 85,57%
- Especificidade relativa: 94,44%
- Acurácia relativa: 88,74%

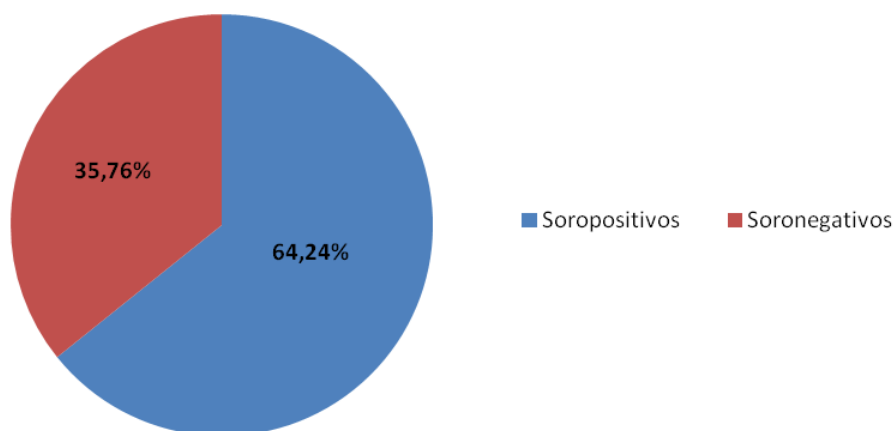
A descrição dos resultados de comparação do ELISA e do ImmunoComb estão no anexo 1. Um gráfico de dispersão foi gerado com estes dados (Figura 17), demonstrando relação positiva dos testes comparados. O resultado do ImmunoComb FCoV (eixo x) está em escala de S (que é uma escala de comparação de intensidade da cor cinza, medida de S0 a S6, onde S0 e S1 são consideradas amostras soronegativas e S2 a S6 soropositivas), e o resultado do ELISA (eixo y) em D.O. ( $A_{450}$ ).



**FIGURA 17.** Gráfico de dispersão mostrando relação positiva entre o ELISA padronizado e o teste usado como referência ImmunoComb FCoV (FIP).

## 5.2. Estudo soroepidemiológico

A soropositividade de 64,24% (97/151) foi detectada pelo teste comercial ImmunoComb FCoV (Figura 18). A estatística descritiva das variáveis do estudo é demonstrada na Tabela 6.



**FIGURA 18.** Gráfico do estudo de soropositividade para presença de anticorpos anti-FCoV.

**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).

| <b>VARIÁVEIS</b>            | <b>POSITIVO</b> | <b>NEGATIVO</b> | <b>TOTAL</b> |
|-----------------------------|-----------------|-----------------|--------------|
| <b>FAIXA ETÁRIA</b>         |                 |                 |              |
| Filhotes - 1 a 12 meses     | 36 (23,84%)     | 34 (22,52%)     | 70 (46,36%)  |
| Jovens - > 1 ano a 3 anos   | 20 (13,25%)     | 9 (5,96%)       | 29 (19,21%)  |
| Adultos - > 3 anos a 8 anos | 25 (16,56%)     | 7 (4,64%)       | 32 (21,19%)  |
| Idosos - > 8 anos           | 16 (10,60%)     | 4 (2,65%)       | 20 (13,25%)  |
| <b>RAÇA</b>                 |                 |                 |              |
| SRD                         | 63 (41,72%)     | 48 (31,79%)     | 111 (73,51%) |
| Persa                       | 29 (19,21%)     | 4 (2,64%)       | 33 (21,85%)  |
| Exótico                     | 2 (1,32%)       | 0 (0,0%)        | 2 (1,32%)    |
| Siamês                      | 2 (1,32%)       | 2 (1,32%)       | 4 (2,65%)    |
| Maine Coon                  | 1 (0,66%)       | 0 (0,00%)       | 1 (0,66%)    |
| <b>GÊNERO</b>               |                 |                 |              |
| Macho                       | 45 (29,80%)     | 33 (21,85%)     | 78 (51,65%)  |
| Fêmea                       | 52 (34,44%)     | 21 (13,91%)     | 73 (48,35%)  |
| <b>CONDIÇÃO REPRODUTIVA</b> |                 |                 |              |
| Inteiro                     | 31 (20,53%)     | 7 (4,64%)       | 38 (25,17%)  |
| Castrado                    | 66 (43,71%)     | 47 (31,13%)     | 113 (74,83%) |
| <b>ACESSO À RUA</b>         |                 |                 |              |
| SIM                         | 22 (14,57%)     | 32 (21,19%)     | 54 (35,76%)  |
| NÃO                         | 75 (49,67%)     | 22 (14,57%)     | 97 (64,24%)  |
| <b>MODO DE CRIAÇÃO</b>      |                 |                 |              |
| Solitário                   | 8 (5,30%)       | 5 (3,31%)       | 13 (8,61%)   |
| Grupo                       | 89 (58,94%)     | 49 (32,45%)     | 138 (91,39%) |

As análises feitas com as variáveis do estudo individualmente, demonstraram que somente as variáveis faixa etária ( $p=0,0157$ ), condição reprodutiva ( $p=0,0074$ ) e acesso à rua ( $p=0,0001$ ) mostraram-se significativas (Tabela 7).

**TABELA 7.** Significância estatística (p-valor) para cada variável.

| <b>Variável</b>      | <b>*p-valor (regressão logística)</b> |
|----------------------|---------------------------------------|
| Faixa etária         | 0,0157                                |
| Raça                 | 1,0000                                |
| Gênero               | 0,0818                                |
| Condição reprodutiva | 0,0074                                |
| Acesso à rua         | 0,0001                                |
| Modo de criação      | 0,8325                                |

p-valores significativos menor ou igual a 0,05.

As três variáveis que apresentaram-se significativas (Tabela 7), analisadas conjuntamente, ajudam a explicar o fenômeno da soropositividade na população estudada (p-valores menores do que 0,05) conforme a Tabela 8.

**TABELA 8.** Regressão logística (p-valor) com as variáveis significativas analisadas em conjunto.

| Variável             | Graus de Liberdade | Estatística qui-quadrado | p-valor |
|----------------------|--------------------|--------------------------|---------|
| Faixa etária         | 3                  | 10,42                    | 0,0153  |
| Condição reprodutiva | 1                  | 4,39                     | 0,0361  |
| Acesso à rua         | 1                  | 12,49                    | 0,0004  |

p-valores significativos menor ou igual a 0,05.

As diferentes categorias das variáveis faixa etária, condição reprodutiva e acesso à rua apresentaram diferenças estatísticas quando comparadas, e estão descritas na Tabela 9. Quanto à faixa etária, encontrou-se diferenças estatísticas quando comparado a categoria adulto x filhote ( $p=0,0029$ ); e as categorias em conjunto adulto e idoso x filhote e jovem ( $p=0,0317$ ). Houve também diferenças estatísticas entre animais castrados e inteiros ( $p=0,0361$ ), e entre animais com e sem acesso à rua ( $p=0,0004$ )

**TABELA 9.** Significância estatística da diferença entre diversas categorias das variáveis faixa etária, condição reprodutiva e acesso à rua.

| Comparação                                 | Graus de Liberdade | Estatística qui-quadrado | p-valor |
|--|--------------------|--------------------------|---------|
| Filhote x Jovem                            | 1                  | 2,35                     | 0,1256  |
| Jovem x Adulto                             | 1                  | 1,46                     | 0,2275  |
| Adulto x Idoso                             | 1                  | 0,23                     | 0,6318  |
| Adulto x Filhote                           | 1                  | 8,89                     | 0,0029* |
| Idoso x Filhote                            | 1                  | 3,44                     | 0,0635  |
| Idoso x Jovem                              | 1                  | 0,29                     | 0,5902  |
| (Filhote e Idoso) x (Jovem e Adulto)       | 1                  | 1,50                     | 0,2201  |
| (Adulto e Idoso) x (Filhote e Jovem)       | 1                  | 4,62                     | 0,0317* |
| Condição reprodutiva (castrado ou inteiro) | 1                  | 4,39                     | 0,0361* |
| Acesso à rua (sim ou não)                  | 1                  | 12,49                    | 0,0004* |

p-valores significativos menor ou igual a 0,05.

Para os p-valores menores ou iguais a 0,05 da Tabela 9, foi calculado a razão de chances e seus respectivos intervalos de confiança (95%), que estão descritos na Tabela 10. Verificou-se que a chance de ter anticorpos anti- FCoV de animais inteiros é 2,76 vezes mais quando comparados com animais castrados; animais sem acesso à rua tem 4 vezes mais chances quando comparados com animais com acesso à rua; animais adultos

têm 4,53 vezes mais chances quando comparados com animais filhotes; animais adultos e idosos tem 6,7 mais chances quando comparados com animais filhotes e jovens.

**TABELA 10.** Estimativas e Intervalos de confiança (95%) para a razão de chance.

| Variável       | Variável        | Estimativa | L. I.* | L. S.*               |
|----------------|-----------------|------------|--------|----------------------|
| Inteiro        | Castrado        | 2,7624     | 1,0276 | 7,4254 <sup>#</sup>  |
| Acesso Não     | Acesso Sim      | 4,0044     | 1,8293 | 8,7653 <sup>#</sup>  |
| Jovem          | Filhote         | 2,1357     | 0,7951 | 3,1482               |
| Adulto         | Filhote         | 4,5367     | 1,5854 | 12,9817 <sup>#</sup> |
| Idoso          | Filhote         | 3,1562     | 0,8785 | 11,3395              |
| Adulto         | Jovem           | 2,1242     | 0,6196 | 7,2766               |
| Idoso          | Jovem           | 1,4780     | 0,3518 | 6,2090               |
| Adulto         | Idoso           | 1,4372     | 0,3294 | 6,2703               |
| Adulto e Idoso | Filhote e Jovem | 6,7050     | 1,1300 | 39,7866 <sup>#</sup> |

\*: L.I e L.S: Limite inferior e limite superior do intervalo de confiança (95%).

#: Limite superior de intervalos de confiança (95%) que não contém o valor 1.

## 6. DISCUSSÃO

### 6.1. Produção do antígeno recombinante e ELISA indireto

Os coronavírus apresentam dificuldade de crescimento em cultivo de células, e o uso de antígenos recombinantes é bastante comum, pois são mais práticos de se obter, possibilitando a produção de grande quantidade de proteína e utilizando métodos que facilitam a sua purificação. A proteína N, por ser bastante conservada e altamente imunogênica, é a mais utilizada como antígeno recombinante em técnicas sorológicas, e já foi demonstrado o seu uso com sucesso no diagnóstico sorológico para coronavírus de outras espécies, como canino, aviário e humano (destacando a SARS) (PRATELLI *et al.*, 2002; TIMANI *et al.*, 2004; WOO *et al.*, 2004; CARATTOLI *et al.*, 2005).

O ELISA indireto teve sua padronização parcial durante os experimentos do mestrado (Almeida, A.C.S, 2013). A técnica apresentava grande instabilidade em momentos de repetição, e após análises de diversos testes que foram realizados, chegou-se à conclusão que a instabilidade estava sendo causada pelo antígeno, possivelmente pela presença da proteína de fusão GST, a qual se encontra na sequência do plasmídeo pGS21a, anteriormente ao sítio de inserção da sequência da proteína N do FCoV e, posteriormente à região responsável pela síntese da 6xHIS. A proteína de fusão GST que apresenta um tamanho aproximado de 29 kDa, poderia impedir o contato dos anticorpos a seus sítios de recepção na molécula do antígeno, que no caso apresenta um tamanho aproximado de 42 kDa, ou poderia provocar um processo de agregação das cadeias polipeptídicas produzidas, levando assim, à instabilidade dos resultados.

Segundo dados de literatura (COMENALE, 2012) o uso da proteína de fusão GST pode ajudar a estabilizar a proteína de interesse, protegê-la contra a clivagem de proteases intracelulares, além de aumentar a sua solubilidade. Entretanto, pode-se observar uma instabilidade na proteína de interesse, devido à GST interferir na conformação correta desta proteína. Também, tem se descrito que o sistema com a GST não tem sido bom para expressar proteínas maiores que 20 kDa, como no caso do presente estudo, pois por motivos ainda desconhecidos, acontecem paradas prematuras de transcrição e tradução, produzindo assim, muita GST isolada sem a proteína de interesse (COMENALE, 2012). Desta forma, foram realizadas etapas para clivagem da GST, utilizando a EK, seguida de várias tentativas de purificação da proteína de

interesse. Para tanto foi necessário produzir maiores quantidades da proteína de interesse.

Para a etapa de purificação inicial foi utilizada a concentração de 500 mmol/L de imidazol no tampão de eluição, visando um alto rendimento final para que todos os testes necessários pudessem ser realizados. Devido a esta alta concentração do imidazol, juntamente com o alto rendimento da produção, houve uma significativa contaminação com frações da bactéria (presença de muitas bandas de tamanhos inespecíficos), ocorrendo assim, uma purificação parcial da amostra de interesse. Para a etapa de diálise foram testados alguns tampões devido a precipitação que a proteína apresentava no momento da retirada do imidazol, sendo necessária realizar esta etapa para o uso da EK na fase seguinte. A concentração de NaCl de 500 mmol/L foi mantida nos tampões utilizados desde a etapa de lise da bactéria. Todo o procedimento foi realizado a 4°C e em duas etapas, na qual a concentração de imidazol foi sendo reduzida gradualmente (500-200-0 mmol/L). Ao final da diálise, a amostra total ao ser recuperada da membrana, precisou ser dividida em alíquotas de 0,5 mL ao invés de ser armazenada em um único tubo de 15 mL. Todos estes procedimentos realizados juntos foram fundamentais para que a proteína se mantivesse estável, permitindo a continuação do seu uso nas etapas seguintes. A reação enzimática com a EK apresentou boa eficiência, sendo possível a visualização no gel de SDS-PAGE das três possíveis frações de 72, 42 e 29 kDa. Foi necessário após a reação com a EK realizar a inativação da mesma, que quando mantida na amostra causava a degradação da proteína de interesse. Foi realizado o western e dot blotting para verificação da especificidade das frações obtidas. Com o western, foi possível visualizar que os soros dos gatos positivo e negativo não reagiram inespecificamente com a fração da GST. Já no dot blotting, podemos observar que os anticorpos presentes nos soros dos gatos positivos e negativos têm uma baixa reatividade com a fração da GST mostrando uma fraca marcação na fita. Essa marcação pode ter ocorrido pela presença das frações inespecíficas da bactéria, que os soros dos gatos positivos e negativos para FCoV podem ter reconhecido por conterem anticorpos policlonais.

Todos os testes realizados para separação das proteínas pós-reação com a EK não apresentaram resultados satisfatórios. Tanto pela técnica de colunas de cromatografia de afinidade, como pela técnica de coluna de gel filtração, a fração da proteína N (42 kDa) e da GTS (29 kDa) permaneceram juntas na mesma alíquota após os procedimentos.

Inicialmente, foram usadas as colunas de cromatografia de afinidade (para histidina e para GST), e a proteína de interesse ficou ligada nas duas colunas nos primeiros testes realizados, onde ela deveria ter passado no momento da aplicação da amostra. Após análise do gel de SDS-PAGE observou-se que a proteína estava presente somente na etapa de eluição, juntamente com as outras frações de 72 e 29 kDa. Em um segundo teste com a coluna de afinidade a GST, a proteína de interesse passou pela coluna no momento da aplicação mas a GST passou junto (pela afinidade a GST teria que ter ficado ligada na coluna). Para a coluna de gel filtração foram utilizadas duas colunas com resoluções diferentes e as frações também permaneceram juntas. Com os testes, foi possível obter alíquotas que continham a proteína N e a GST clivadas, e alíquotas que só continham a fração da GST.

Com os resultados obtidos do western e dot blotting, e das tentativas de separação das frações pós-reação com a EK sem sucesso, foi utilizado o antígeno total (proteína N + GST + frações de vários tamanhos inespecíficos) após a clivagem com a EK e sem a purificação, nos testes do ELISA. Inicialmente, foram realizados testes para determinar a concentração ideal de antígeno para a etapa de adsorção e a diluição ideal para a etapa dos soros, para que assim, novos testes pudessem ser feitos. Definidos estes valores, um novo teste foi realizado para avaliar se a GST clivada estaria interferindo e se os anticorpos estariam se ligando inespecificamente nela. Foi possível verificar que houve uma baixa reatividade dos anticorpos na presença da GST, e como o antígeno não se encontrava puro, não se definiu exatamente em qual das frações esses anticorpos estariam se ligando. Como a etapa de adsorção é feita com uma quantidade do antígeno total, não se pode definir a concentração exata de proteína N que estava permanecendo por poço, podendo explicar assim, a variação nos valores das D.O.s das amostras testadas (Tabela 5). Apesar dessa variação, a utilização do cálculo da relação S/P (índice ELISA) corrigiu os valores destas D.O.s, e também dos controles positivo e negativo. Uma vez que o antígeno total foi clivado com a EK, a interferência da GST na conformação da proteína de interesse foi minimizada (resultados do western e dot blotting), motivo este, que nos levou a adicionar diferentes concentrações de GST purificada ao antígeno total clivado. Os resultados demonstraram uma baixa interferência na presença adicional da GST clivada.

Com o ponto de corte estabelecido, foi possível a classificação dos resultados, onde os animais foram categorizados como soropositivos ou soronegativos. Como o

ELISA é analisado através de valores de D.O. ( $A_{450}$ ) e o ImmunoComb em escala de cinza (S0 a S6), a comparação quantitativa entre os testes é prejudicada. A leitura do kit comercial em escala de cinza contribui para resultados que são subjetivos, podendo em alguns casos, os resultados se apresentarem ambíguos, aumentando assim, a discordância dos testes. O ELISA padronizado, utilizando o antígeno nas condições já discutidas acima, comparados com o kit ImmunoComb (teste referência utilizado neste projeto), apresentou valores de sensibilidade (85,57%), especificidade (94,44%) e acurácia relativa (88,74%) considerados muito bons, demonstrando eficiência e capacidade discriminatória do teste. O gráfico de dispersão gerado com os dados da comparação entre o ELISA e o ImmuComb também apresentou resultado satisfatório, demonstrando uma relação positiva entre os testes. O antígeno utilizado no kit ImmunoComb FCoV (FIP) é o FCoV sorotipo I inativado e, esta não é a técnica considerada como padrão ouro do diagnóstico sorológico da infecção pelo FCoV (a técnica padrão-ouro é a Imunofluorescência indireta), mas o seu uso tem sido descrito com resultados satisfatórios para algumas situações na rotina clínica veterinária (ADDIE *et al.* 2004a; ADDIE *et al.*, 2015).

A técnica do ELISA indireto padronizado mostrou que a proteína N do FCoV produzida é antigênica, demonstrando capacidade de interação com anticorpos de um gato naturalmente infectado pelo FCoV, e o teste apresentou valores satisfatórios de sensibilidade, especificidade e acurácia relativa, demonstrando eficiência e capacidade discriminatória.

## **6.2. Estudo soroepidemiológico**

A soropositividade de 64,24% foi detectada pelo kit ImmunoComb FCoV (FIP) e verificou-se que a infecção pelo FCoV está amplamente disseminada na população estudada. A presença dos anticorpos está acima da esperada para animais domiciliados, que segundo dados mundiais da literatura é de 30 a 50%. Não há dados disponíveis de estudos realizados no Brasil. (ADDIE e JARRETT, 2006; BROWN *et al.*, 2009; PEDERSEN, 2009).

Com relação à faixa etária foi coletado um número maior de animais filhotes (1 a 12 meses), representando 46,36% do total. A idade é considerada como um importante fator de risco para o desenvolvimento da PIF (HARTMANN, 2005; HORZINEK *et al.*,

2008). Os gatos podem se infectar com o FCoV em todas as faixas etárias, porém os que possuem o maior risco de desenvolver a doença são os jovens e filhotes (três meses a três anos). Os gatos idosos com mais de 10 anos também são considerados animais de alto risco, devido ao declínio do seu sistema imunológico (ROHRBACH *et al.*, 2001; ADDIE e JARRETT, 2006). Foi demonstrado pelas análises estatísticas que os animais adultos apresentam maior chance de serem soropositivos quando comparados com filhotes. E quando analisados em grupos (filhotes/jovens e adultos/idosos), o grupo dos adultos e idosos também tem maior chance de ter anticorpos anti-FCoV. AKKAN e KARACA (2009), em um estudo de soroprevalência também encontraram maior soropositividade nos adultos e idosos. Estes animais possivelmente por terem maior idade, possuem assim, maiores chances de entrar em contato com o vírus e produzir anticorpos.

No presente estudo, 73,51% dos animais eram SRD, e não foram encontradas diferenças estatísticas com as raças analisadas, possivelmente pelo baixo número de animais amostrados de determinadas raças. Todas as raças de gatos podem se infectar com o FCoV e os animais desenvolver a PIF, mas para alguns gatos de raça pura parece haver uma predisposição genética ao desenvolvimento da doença na forma sistêmica (HORZINEK *et al.*, 2008). Algumas raças são citadas, como o Abissínio, Bengal, Birmanês, Himalaio, Ragdoll, Rexes, Burmês, Exótico Shorthair, Manx, Persa, Azul Russo (Russian Blue) e Siamês (MALIK e NORRIS, 2006; PESTEANU-SOMOGYI *et al.*, 2006; HORZINEK *et al.*, 2008). O aumento da prevalência da doença para estas raças puras pode ser devido à concentração de fatores hereditários obtidos através de cruzamentos consanguíneos (FOLEY e PEDERSEN, 1996).

Em relação ao gênero, 51,65% eram machos e 48,35% eram fêmeas. Quanto à soropositividade não foram encontradas diferenças estatísticas entre eles, corroborando com dados do estudo de MALIK e NORRIS, 2006. Alguns estudos demonstraram uma maior predisposição para o desenvolvimento da PIF em gatos machos (ROBISON *et al.*, 1971; ROHRBACH *et al.*, 2001; PESTEANU-SOMOGYI *et al.*, 2006). Para a condição reprodutiva do total de animais amostrados 74,83% eram castrados, e destes animais 43,71% apresentaram resultado positivo no teste. Para os animais inteiros a soropositividade foi de 20,53%. As análises estatísticas demonstraram que animais inteiros tem 2,76 vezes mais chances de serem soropositivos quando comparados com animais castrados. Alguns autores descrevem um maior risco para o desenvolvimento da doença em gatos inteiros (ROBISON *et al.*, 1971; ROHRBACH *et al.*, 2001;

PESTEANU-SOMOGYI *et al.*, 2006; WORTHING *et al.*, 2012). Gatos machos e inteiros tendem a sair mais para a rua se houver oportunidade, sendo assim, submetidos a um maior estresse por brigas (disputa de território e fêmeas) podendo ficar mais vulnerável ao desenvolvimento da PIF, além de aumentar as chances destes animais entrarem em contato com uma maior variabilidade de cepas do FCoV.

Para o modo de criação, 91,39% viviam em grupo de 2 a 10 gatos. Ambientes com múltiplos gatos parecem ser de maior risco para o desenvolvimento da doença, sendo a prevalência da infecção alta em casas com vários co-habitantes (ADDIE e JARRET, 2006). Dado que a maior parte dos gatos deste estudo viviam em ambientes com outros felinos, não foram encontradas diferenças estatísticas para este fator de risco nesta população. Para o acesso à rua foram encontradas diferenças estatísticas, onde animais sem acesso têm 4 vezes mais chances de serem soropositivos quando comparados com animais que tem acesso. Gatos sem acesso à rua passam a maior parte do tempo confinados sendo expostos constantemente a grandes quantidades de agentes infecciosos, principalmente em ambientes onde há mais de um gato. Mudanças no manejo dos gatos domésticos também tem contribuído para uma maior disseminação destes agentes, como por exemplo, a introdução da vasilha sanitária, onde estes gatos acabam sendo expostos a grandes quantidades de FCoV nas fezes diariamente (ADDIE e JARRET, 2006). Estes animais tem possivelmente contato com uma menor variabilidade de cepas do FCoV, e o manejo realizado por seus proprietários (como limpeza e desinfecção, o não acúmulo de animais em um único ambiente) é de fundamental importância para prevenção do desenvolvimento da PIF.

Os dados obtidos com o estudo ajudam a traçar um perfil epidemiológico da população estudada, fornecendo assim, informações regionais da soropositividade e fatores de risco da 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 soropidemiológico 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.; GOLDBER, 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.; MENGER, 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.

## 9. ARTIGO CIENTÍFICO

Trabalho a ser enviado para a revista Ciência Rural.

### 9.1. Normas de Publicação da Revista:

#### Objetivo e Política editorial

1. CIÊNCIA RURAL - Revista Científica do Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria publica artigos científicos, revisões bibliográficas e notas referentes à área de Ciências Agrárias que deverão ser destinados com exclusividade.

#### Preparação de originais

2. Os artigos científicos, revisões e notas devem ser encaminhados via eletrônica editados em idioma Português ou Inglês, todas as linhas deverão ser numeradas e paginados no lado inferior direito. O trabalho deverá ser digitado em tamanho A4 210 x 297mm, com no máximo, 25 linhas em espaço duplo, com margens superior, inferior, esquerda e direita em 2,5cm, fonte Times New Roman, tamanho 12. O máximo de páginas será 15 para artigos científicos, 20 para revisão bibliográfica e 8 para nota, incluindo tabelas, gráficos e ilustrações. Cada figura e ilustração deverá ser enviado em arquivos separados e constituirá uma página. Tabelas, gráficos e figuras não poderão estar com apresentação paisagem.

3. O artigo científico deverá conter os seguintes tópicos: Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Introdução com Revisão de Literatura; Material e Métodos; Resultados e Discussão; Conclusão e Referências; Agradecimento(s) e Apresentação; Fontes de Aquisição; Informe Verbal; Comitê de Ética e Biossegurança devem aparecer antes das referências. Pesquisa envolvendo seres humanos e animais obrigatoriamente devem apresentar parecer de aprovação de um comitê de ética institucional já na submissão. (Modelo .doc, .pdf).

4. A revisão bibliográfica deverá conter os seguintes tópicos: Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Introdução; Desenvolvimento; Conclusão; e Referências. Agradecimento(s) e Apresentação; Fontes de Aquisição e Informe Verbal; Comitê de Ética e Biossegurança devem aparecer antes das referências. Pesquisa envolvendo seres humanos e animais obrigatoriamente devem apresentar parecer de aprovação de um comitê de ética institucional já na submissão. (Modelo .doc, pdf).

5. A nota deverá conter os seguintes tópicos: Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Texto (sem subdivisão, porém com introdução; metodologia; resultados e discussão e conclusão; podendo conter tabelas ou figuras); Referências. Agradecimento(s) e Apresentação; Fontes de Aquisição e Informe Verbal; Comitê de Ética e Biossegurança devem aparecer antes das referências. Pesquisa

envolvendo seres humanos e animais obrigatoriamente devem apresentar parecer de aprovação de um comitê de ética institucional já na submissão (Modelo doc, pdf)

6. Não serão fornecidas separatas. Os artigos estão disponíveis no formato pdf no endereço eletrônico da revista ([www.scielo.br/cr](http://www.scielo.br/cr)).

7. Descrever o título em português e inglês (caso o artigo seja em português) - inglês português (caso o artigo seja em inglês). Somente a primeira letra do título do artigo deve ser maiúscula exceto no caso de nomes próprios. Evitar abreviaturas e nomes científicos no título. O nome científico só deve ser empregado quando estritamente necessário. Esses devem aparecer nas palavras-chave e resumo e demais seções quando necessários.

8. As citações dos autores, no texto, deverão ser feitas com letras maiúsculas seguidas do ano de publicação, conforme exemplos: Esses resultados estão de acordo com os reportados por MILLER & KIPLINGER (1966) e LEE et al. (1996), como uma má formação congênita (MOULTON, 1978).

9. As Referências deverão ser efetuadas no estilo ABNT (NBR 6023/2000) conforme normas próprias da revista.

9.1. Citação de livro:

- JENNINGS, P.B. The practice of large animal surgery. Philadelphia : Saunders, 1985. 2v.
- TOKARNIA, C.H. et al. (Mais de dois autores) Plantas tóxicas da Amazônia a bovinos e outros herbívoros. Manaus : INPA, 1979. 95p.

9.2. Capítulo de livro com autoria:

- GORBAMAN, A. A comparative pathology of thyroid. In: HAZARD, J.B.; SMITH, D.E. The thyroid. Baltimore : Williams & Wilkins, 1964. Cap.2, p.32-48.

9.3. Capítulo de livro sem autoria:

- COCHRAN, W.C. The estimation of sample size. In: \_\_\_\_\_. Sampling techniques. 3.ed. New York : John Willey, 1977. Cap.4, p.72-90.
- TURNER, A.S.; McILWRAITH, C.W. Fluidoterapia. In: \_\_\_\_\_. Técnicas cirúrgicas em animais de grande porte. São Paulo : Roca, 1985. p.29-40.

9.4. Artigo completo:

Sempre que possível o autor deverá acrescentar a url para o artigo referenciado e o número de identificação DOI (Digital Object Identifiers) conforme exemplos abaixo:

- MEWIS, I.; ULRICHS, CH. Action of amorphous diatomaceous earth against different stages of the stored product pests *Tribolium confusum* (Coleoptera: Tenebrionidae), *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae), *Sitophilus granarius* (Coleoptera: Curculionidae) and *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae). Journal of Stored Product Research, Amsterdam (Cidade opcional), v.37, p.153-164, 2001. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0022-474X\(00\)00016-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-474X(00)00016-3)>. Acesso em: 20 nov. 2008. doi: 10.1016/S0022-474X(00)00016-3.

- PINTO JUNIOR, A.R. et al (Mais de 2 autores). Resposta de *Sitophilus oryzae* (L.), *Cryptolestes ferrugineus* (Stephens) e *Oryzaephilus surinamensis* (L.) a diferentes concentrações de terra de diatomácea em trigo armazenado a granel. *Ciência Rural*, Santa Maria (Cidade opcional), v. 38, n. 8, p.2103-2108, nov. 2008. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-84782008000800002&lng=pt&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782008000800002&lng=pt&nrm=iso)>. Acesso em: 25 nov. 2008. doi: 10.1590/S0103-84782008000800002.

#### 9.5. Resumos:

- RIZZARDI, M.A.; MILGIORANÇA, M.E. Avaliação de cultivares do ensaio nacional de girassol, Passo Fundo, RS, 1991/92. In: JORNADA DE PESQUISA DA UFSM, 1., 1992, Santa Maria, RS. Anais... Santa Maria : Pró-reitoria de Pós-graduação e Pesquisa, 1992. V.1. 420p. p.236.

#### 9.6. Tese, dissertação:

- COSTA, J.M.B. Estudo comparativo de algumas características digestivas entre bovinos (Charolês) e bubalinos (Jafarabad). 1986. 132f. Monografia/Dissertação/Tese (Especialização/ Mestrado/Doutorado em Zootecnia) - Curso de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Santa Maria.

#### 9.7. Boletim:

- ROGIK, F.A. Indústria da lactose. São Paulo : Departamento de Produção Animal, 1942. 20p. (Boletim Técnico, 20).

#### 9.8. Informação verbal:

- Identificada no próprio texto logo após a informação, através da expressão entre parênteses. Exemplo: ... são achados descritos por Vieira (1991 - Informe verbal). Ao final do texto, antes das Referências Bibliográficas, citar o endereço completo do autor (incluir E-mail), e/ou local, evento, data e tipo de apresentação na qual foi emitida a informação.

#### 9.9. Documentos eletrônicos:

- MATERA, J.M. Afecções cirúrgicas da coluna vertebral: análise sobre as possibilidades do tratamento cirúrgico. São Paulo : Departamento de Cirurgia, FMVZ-USP, 1997. 1 CD.

- GRIFON, D.M. Arthroscopic diagnosis of elbow displasia. In: WORLD SMALL ANIMAL VETERINARY CONGRESS, 31., 2006, Prague, Czech Republic. Proceedings... Prague: WSAVA, 2006. p.630-636. Capturado em 12 fev. 2007. Online. Disponível em: <http://www.ivis.org/proceedings/wsava/2006/lecture22/Griffon1.pdf?LA=1>

- UFRGS. Transgênicos. Zero Hora Digital, Porto Alegre, 23 mar. 2000. Especiais. Capturado em 23 mar. 2000. Online. Disponível na Internet: <http://www.zh.com.br/especial/index.htm>.

- ONGPHIPHADHANAKUL, B. Prevention of postmenopausal bone loss by low and conventional doses of calcitriol or conjugated equine estrogen. *Maturitas*, (Ireland), v.34, n.2, p.179-184, Feb 15, 2000. Obtido via base de dados MEDLINE. 1994-2000.

23 mar. 2000. Online. Disponível na Internet [http://www. Medscape.com/server-java/MedlineSearchForm](http://www.Medscape.com/server-java/MedlineSearchForm).

- MARCHIONATTI, A.; PIPPI, N.L. Análise comparativa entre duas técnicas de recuperação de úlcera de córnea não infectada em nível de estroma médio. In: SEMINARIO LATINOAMERICANO DE CIRURGIA VETERINÁRIA, 3., 1997, Corrientes, Argentina. Anais... Corrientes : Facultad de Ciencias Veterinarias - UNNE, 1997. Disquete. 1 disquete de 31/2. Para uso em PC

10. Desenhos, gráficos e fotografias serão denominados figuras e terão o número de ordem em algarismos arábicos. A revista não usa a denominação quadro. As figuras devem ser disponibilizadas individualmente por página. Os desenhos figuras e gráficos (com largura de no máximo 16cm) devem ser feitos em editor gráfico sempre em qualidade máxima com pelo menos 300 dpi em extensão .tiff. As tabelas devem conter a palavra tabela, seguida do número de ordem em algarismo arábico e não devem exceder uma lauda.

11. Os conceitos e afirmações contidos nos artigos serão de inteira responsabilidade do(s) autor(es).

12. Será obrigatório o cadastro de todos autores nos metadados de submissão. O artigo não tramitará enquanto o referido item não for atendido. Excepcionalmente, mediante consulta prévia para a Comissão Editorial outro expediente poderão ser utilizados.

13. Lista de verificação (Checklist pdf ou doc)

14. A taxa de tramitação é de R\$ 80,00 e a de publicação é de R\$ 100,00 por página impressa. A taxa de publicação somente deverá ser paga após a revisão final das provas do manuscrito pelos autores. Professores do Centro de Ciências Rurais e os Programas de Pós-graduação do Centro têm os seus artigos previamente pagos pelo CCR, estando isentos da taxa de publicação. Trabalhos submetidos por esses autores, no entanto, devem pagar a taxa de tramitação. No caso de impressão colorida, todos os trabalhos publicados deverão pagar um adicional de R\$ 600,00 por página colorida impressa, independentemente do número de figuras na respectiva página.

Os pagamentos poderão ser efetuados por:

a) Transferência/depósito no Banco do Brasil, Agência 1484-2, Conta Corrente 36.189-5 em nome da FATEC (CNPJ: 89.252.431/0001-59) - Projeto 96945. A submissão do artigo obrigatoriamente deve estar acompanhada da taxa de tramitação, podendo ser enviada via fax (55 3220 8695/3220 8698) ou ainda enviado por email ([cienciarural@mail.ufsm.br](mailto:cienciarural@mail.ufsm.br)) para que se possa fazer a verificação e prosseguir com a tramitação do artigo (Em ambos os casos o nome e endereço completo são obrigatórios para a emissão da fatura).

b) Solicitação de fatura (.doc ou .pdf). Nessa modalidade o formulário disponível deverá ser encaminhado devidamente preenchido via e-mail ou fax (55 3220 8695/3220 8698) para que possamos encaminhar a solitação a Fundação que administra os nossos recursos e esta encaminhará a fatura ao endereço especificado no formulário.

c) O pagamento da taxa de tramitação também pode ser feito por meio online através de cartão de crédito (VISA) através deste link

15. Os artigos serão publicados em ordem de aprovação.

16. Os artigos não aprovados serão arquivados havendo, no entanto, o encaminhamento de uma justificativa pelo indeferimento.

17. Em caso de dúvida, consultar artigos de fascículos já publicados antes de dirigir-se à Comissão Editorial.

#### Critérios de avaliação

Todos os trabalhos submetidos são inicialmente examinados pela equipe CR, comitê editorial e de área e então enviados a dois avaliadores ad hoc no mínimo. As revisões são submetidas normalmente para três consultores ad hoc.

## 9.2. Artigo

Estudo soroepidemiológico da infecção pelo Coronavírus felino (FCoV) em gatos domésticos domiciliados na cidade de Botucatu, São Paulo, Brasil.

Seroepidemiologic study of feline coronavirus (FCoV) infection in domiciled domestic cats from Botucatu city, São Paulo, Brazil.

### RESUMO

O Coronavírus felino (FCoV) é responsável por causar uma das mais importantes doenças infecciosas que acometem os felinos domésticos e selvagens, a peritonite infecciosa felina (PIF), que é uma doença imunomediada, sistêmica, progressiva e fatal. O FCoV é altamente contagioso e a infecção é comum nas populações de felinos domésticos por todo o mundo. O presente estudo objetivou determinar a soropositividade da infecção pelo FCoV e correlacionar aspectos epidemiológicos (fatores de risco) de gatos domésticos domiciliados da cidade de Botucatu, Estado de São Paulo, Brasil. Foram colhidas amostras no volume de 0,5 a 1 mL de sangue total de 151 gatos, das quais foram obtidos os soros após centrifugação. Estes soros foram testados pelo kit ImmunoComb FCoV (FIP)<sup>®</sup> para detecção de anticorpos IgG anti-FCoV. Os fatores de risco avaliados neste estudo foram faixa etária, raça, gênero, condição reprodutiva, acesso à rua e modo de criação (viver solitário ou em grupo). Observou-se uma soropositividade de 64,24% (97/151). Não houve significância estatística para raça ( $p=1,000$ ), gênero ( $p=0,0818$ ) e modo de criação ( $p=0,8325$ ). Para a faixa etária ( $p=0,0157$ ), condição reprodutiva ( $p=0,0074$ ) e acesso à rua ( $p=0,0001$ ) houve significância estatística quanto a soropositividade ( $p\text{-values} \leq 0,05$ ). Através do presente estudo verificou-se que o FCoV está amplamente disseminado na população estudada, onde 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 desta população.

**Palavras-chave:**

Felinos domésticos, Coronavírus felino, Seroepidemiológico, Fatores de Risco.

**ABSTRACT**

The feline coronavirus (FCoV) is responsible for causing one of the most important infectious diseases of domestic and wild felids, the feline infectious (PIF), which is an immune-mediated, systemic, progressive and fatal disease. FCoV is highly contagious and infection is common in domestic feline populations worldwide. The present study aimed to determine the seropositivity of FCoV infection and associate epidemiological aspects (risk factors) of domestic cats domiciled in Botucatu, São Paulo, Brazil. Whole blood samples (0,5 to 1 mL) were collected from 151 cats and sera were extracted by centrifugation. These sera were tested by ImmunoComb FCoV (FIP)® test kit 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 seropositivity was 64,24% (97/151). There was no statistical significance concerning breed ( $p=1,000$ ), sex ( $p=0,0818$ ) and solitary or group living conditions ( $p=0,8325$ ). Age ( $p=0,0157$ ), reproductive condition ( $p=0,0074$ ) and outdoor access ( $p=0,0001$ ) presented statistical significance concerning seropositivity ( $p$ -values  $\leq 0,05$ ). Through the present study it was verified that FCoV is widely disseminated in the studied population, the seropositivity encountered was higher than expected, since the sampled cats were domiciled and not shelter cats. Among the risk factors evaluated, those presenting statistical differences were age, reproductive condition and outdoor access, thus helping to draw an epidemiological profile of this population.

**Key words:**

Domestic cats, Feline coronavirus, Seroepidemiologic, Risk factors.

**INTRODUÇÃO**

O Coronavírus felino (FCoV) pertence à ordem *Nidovirales*, família *Coronaviridae*, gênero *Alphacoronavirus*. São vírus envelopados contendo RNA de fita simples e polaridade positiva (SPARKES, 2006; PRATELLI, 2008). O 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 doença

imunomediada, sistêmica, progressiva e fatal (ADDIE & JARRETT, 2006). A PIF foi descoberta na década de 60 e, desde então, a doença tem sido relatada em todo o mundo (PEDERSEN, 2009; LE PODER, 2011).

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 (ADDIE & JARRETT, 2006; NORSWORTHY et al., 2006; CORNELISSEN et al., 2007).

A infecção por FCoV apresenta ampla distribuição nos felinos domésticos e também pode ser observada nos felinos selvagens. A PIF é mais frequente em ambientes com alta concentração de felinos, pois é onde há maiores taxas de infecção viral e disseminação de variantes FIPV, expondo os animais a elevadas doses infectantes (HOSKINS & LOAR, 1993; FOLEY et al., 1997). O FCoV é mantido nas populações de felinos por intermédio dos animais que atuam como carreadores crônicos, que correspondem a cerca de 20% dentro de um ambiente populoso (HARTMANN, 2005).

A ocorrência da PIF é maior em gatos jovens, com predomínio em animais entre três meses a três anos de idade (ADDIE & JARRETT, 2006). No entanto, podem ocorrer casos em gatos com mais de 10 anos, associados ao declínio da resposta imune. A infecção pelo FCoV é comum em gatos domésticos e anticorpos estão presentes em cerca de 80 a 90% dos gatos que vivem em abrigos ou gatis e, 30 a 50% para animais domiciliados (ADDIE & JARRETT, 2006; BROWN *et al.*, 2009; PEDERSEN, 2009). O FCoV é altamente contagioso e a sua transmissão ocorre pela via fecal-oral, geralmente causando uma infecção intestinal leve. Cerca de 5 a 10% dos gatos que são soropositivos poderão desenvolver a doença e morrer de PIF (ADDIE & JARRETT, 2006; PEDERSEN, 2009).

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. Não há estudos no país que descrevam a soropositividade para FCoV dos felinos domésticos domiciliados. Por isso, a realização de estudos a nível regional e nacional de soroepidemiologia são necessários para que se possa identificar os principais fatores de risco da infecção pelo FCoV na população de gatos domésticos do Brasil . O presente estudo objetivou determinar a soropositividade da infecção pelo FCoV e correlacionar aspectos epidemiológicos (fatores de risco) de gatos domésticos domiciliados da cidade de Botucatu, Estado de São Paulo, Brasil.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Animais e amostras**

Todos os animais do estudo (n=151) são domiciliados e residentes na cidade de Botucatu, Estado de São Paulo, Brasil. Amostras no volume de 0,5 a 1 mL de sangue foram colhidas assepticamente por meio de punção da veia cefálica ou jugular, e acondicionadas em tubo de vidro siliconizado contendo gel ativador de coágulo (Vacutainer®, Becton Dickinson) para obtenção do soro sanguíneo. Estas amostras foram centrifugadas a 4.000g durante 10 minutos e os soros obtidos foram armazenados em microtubos de 1,5 mL livres de nucleases (Axygen®), sendo posteriormente congelados a -20°C até o momento de uso. Dados individuais de cada animal, tais como, idade e/ou faixa etária (filhote, jovem, adulto, senil), raça, gênero, condição reprodutiva (inteiro ou castrado), acesso à rua ou confinado, e modo de criação (mantido em grupo ou solitário) foram obtidos e anotados em uma ficha epidemiológica.

### **Teste sorológico**

Os soros foram testados pelo kit ImmunoComb FCoV (FIP)® (Biogal Galed Labs. Acs. Ltd.) para detecção de anticorpos IgG anti-FCoV, seguindo as recomendações do fabricante. O resultado obtido foi em escala de cinza (intensidade da cor) e a leitura realizada por escaneamento, utilizando o software CombScan, classificando os animais como soropositivos ou soronegativos. A técnica foi realizada no Laboratório de Diagnóstico Molecular, na Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biotecnologia, Botucatu.

### **Análise estatística dos dados**

Foram utilizados os programas Statistical Analysis System (SAS 9.3) e Microsoft Office Excel 2007 para as análises do estudo. Todas as variáveis foram analisadas por métodos de estatística descritiva, apresentando-se a frequência e porcentagem. Para verificar a existência de diferenças estatísticas entre os grupos de cada variável quanto à soropositividade ("0" se a soropositividade foi ausente e "1" se a soropositividade foi presente), foram utilizados modelos de regressão logística, com significância estatística determinada para p-valores  $\leq$  a 0,05. A significância estatística da diferença foi determinada quando o valor 1 não estava incluído no intervalo de confiança de 95%.

### **RESULTADOS**

A soropositividade de 64,24% (97/151) foi detectada. A estatística descritiva das variáveis do estudo é demonstrada na Tabela 1.

**Tabela 1.** Frequência das variáveis faixa etária, raça, gênero, condição reprodutiva, acesso à rua e modo de criação (solitário ou em grupo). Botucatu, 2017.

| <b>VARIÁVEIS</b>            | <b>POSITIVO</b> | <b>NEGATIVO</b> | <b>TOTAL</b> |
|-----------------------------|-----------------|-----------------|--------------|
| <b>FAIXA ETÁRIA</b>         |                 |                 |              |
| Filhotes - 1 a 12 meses     | 36 (23,84%)     | 34 (22,52%)     | 70 (46,36%)  |
| Jovens - > 1 ano a 3 anos   | 20 (13,25%)     | 9 (5,96%)       | 29 (19,21%)  |
| Adultos - > 3 anos a 8 anos | 25 (16,56%)     | 7 (4,64%)       | 32 (21,19%)  |
| Idosos - > 8 anos           | 16 (10,60%)     | 4 (2,65%)       | 20 (13,25%)  |
| <b>RAÇA</b>                 |                 |                 |              |
| SRD                         | 63 (41,72%)     | 48 (31,79%)     | 111 (73,51%) |
| Persa                       | 29 (19,21%)     | 4 (2,64%)       | 33 (21,85%)  |
| Exótico                     | 2 (1,32%)       | 0 (0,0%)        | 2 (1,32%)    |
| Siamês                      | 2 (1,32%)       | 2 (1,32%)       | 4 (2,65%)    |
| Maine Coon                  | 1 (0,66%)       | 0 (0,00%)       | 1 (0,66%)    |
| <b>GÊNERO</b>               |                 |                 |              |
| Macho                       | 45 (29,80%)     | 33 (21,85%)     | 78 (51,65%)  |
| Fêmea                       | 52 (34,44%)     | 21 (13,91%)     | 73 (48,35%)  |
| <b>CONDIÇÃO REPRODUTIVA</b> |                 |                 |              |
| Inteiro                     | 31 (20,53%)     | 7 (4,64%)       | 38 (25,17%)  |
| Castrado                    | 66 (43,71%)     | 47 (31,13%)     | 113 (74,83%) |
| <b>ACESSO À RUA</b>         |                 |                 |              |
| SIM                         | 22 (14,57%)     | 32 (21,19%)     | 54 (35,76%)  |
| NÃO                         | 75 (49,67%)     | 22 (14,57%)     | 97 (64,24%)  |

| <b>MODO DE CRIAÇÃO</b> |             |             |              |
|------------------------|-------------|-------------|--------------|
| Solitário              | 8 (5,30%)   | 5 (3,31%)   | 13 (8,61%)   |
| Grupo                  | 89 (58,94%) | 49 (32,45%) | 138 (91,39%) |

As análises feitas com as variáveis do estudo individualmente, demonstraram que somente as variáveis faixa etária ( $p=0,0157$ ), condição reprodutiva ( $p=0,0074$ ) e acesso à rua ( $p=0,0001$ ) foram significativas (Tabela 2).

**Tabela 2.** Significância estatística (p-valor) para cada variável. Botucatu, 2017.

| <b>Variável</b>      | <b>*p-valor (regressão logística)</b> |
|----------------------|---------------------------------------|
| Faixa etária         | 0,0157*                               |
| Raça                 | 1,0000                                |
| Gênero               | 0,0818                                |
| Condição reprodutiva | 0,0074*                               |
| Acesso à rua         | 0,0001*                               |
| Modo de viver        | 0,8325                                |

\*p-valores significativos menor ou igual a 0,05.

As três variáveis que apresentaram-se significativas (Tabela 2), analisadas conjuntamente, ajudam a explicar o fenômeno da soropositividade na população estudada ( $p$ -valores  $\leq$  do que 0,05) conforme a Tabela 3.

**Tabela 3.** Regressão logística (p-valor) com as variáveis significativas analisadas em conjunto. Botucatu, 2017.

| Variável             | Graus de Liberdade | Estatística qui-quadrado | p-valor |
|----------------------|--------------------|--------------------------|---------|
| Faixa etária         | 3                  | 10,42                    | 0,0153  |
| Condição reprodutiva | 1                  | 4,39                     | 0,0361  |
| Acesso à rua         | 1                  | 12,49                    | 0,0004  |

p-valores significativos menor ou igual a 0,05.

As diferentes categorias das variáveis faixa etária, condição reprodutiva e acesso à rua apresentaram diferenças estatísticas quando comparadas, e estão descritas na Tabela 4. Quanto a faixa etária, encontrou-se diferenças estatísticas quando comparado a categoria adulto x filhote ( $p=0,0029$ ); e as categorias em conjunto adulto e idoso x filhote e jovem ( $p=0,0317$ ). Houve também diferenças estatísticas entre animais castrados e inteiros ( $p=0,0361$ ), e entre animais com e sem acesso à rua ( $p=0,0004$ )

**Tabela 4.** Significância estatística da diferença entre diversas categorias das variáveis faixa etária, condição reprodutiva e acesso à rua. Botucatu, 2017.

| Comparação                                 | Graus de Liberdade | Estatística qui-quadrado | p-valor |
|--|--------------------|--------------------------|---------|
| Filhote x Jovem                            | 1                  | 2,35                     | 0,1256  |
| Jovem x Adulto                             | 1                  | 1,46                     | 0,2275  |
| Adulto x Idoso                             | 1                  | 0,23                     | 0,6318  |
| Adulto x Filhote                           | 1                  | 8,89                     | 0,0029* |
| Idoso x Filhote                            | 1                  | 3,44                     | 0,0635  |
| Idoso x Jovem                              | 1                  | 0,29                     | 0,5902  |
| (Filhote e Idoso) x (Jovem e Adulto)       | 1                  | 1,50                     | 0,2201  |
| (Adulto e Idoso) x (Filhote e Jovem)       | 1                  | 4,62                     | 0,0317* |
| Condição reprodutiva (castrado ou inteiro) | 1                  | 4,39                     | 0,0361* |
| Acesso à rua (sim ou não)                  | 1                  | 12,49                    | 0,0004* |

\*p-valores significativos menor ou igual a 0,05.

Para os p-valores  $\leq$  a 0,05 da Tabela 4, foi calculado a razão de chances e seus respectivos intervalos de confiança (95%), que estão descritos na Tabela 5. Verificou-se que a chance de ter anticorpos anti- FCoV em animais inteiros é 2,76 vezes maior quando comparados com animais castrados; animais sem acesso à rua tem 4 vezes mais chances quando comparados com animais com acesso à rua; animais adultos têm 4,53 vezes mais chances quando comparados com animais filhotes; animais adultos e idosos tem 6,7 mais chances quando comparados com animais filhotes e jovens.

**Tabela 5.** Estimativas e Intervalos de confiança (95%) para a razão de chances. Botucatu, 2017.

| Variável       | Variável        | Estimativa | L. I.* | L. S.*               |
|----------------|-----------------|------------|--------|----------------------|
| Inteiro        | Castrado        | 2,7624     | 1,0276 | 7,4254 <sup>#</sup>  |
| Acesso Não     | Acesso Sim      | 4,0044     | 1,8293 | 8,7653 <sup>#</sup>  |
| Jovem          | Filhote         | 2,1357     | 0,7951 | 3,1482               |
| Adulto         | Filhote         | 4,5367     | 1,5854 | 12,9817 <sup>#</sup> |
| Idoso          | Filhote         | 3,1562     | 0,8785 | 11,3395              |
| Adulto         | Jovem           | 2,1242     | 0,6196 | 7,2766               |
| Idoso          | Jovem           | 1,4780     | 0,3518 | 6,2090               |
| Adulto         | Idoso           | 1,4372     | 0,3294 | 6,2703               |
| Adulto e Idoso | Filhote e Jovem | 6,7050     | 1,1300 | 39,7866 <sup>#</sup> |

\*: L.I e L.S: Limite inferior e limite superior do intervalo de confiança (95%).

#: Limite superior de intervalos de confiança (95%) que não contém o valor 1.

## DISCUSSÃO

A soropositividade de 64,24% foi detectada pelo kit ImmunoComb FCoV (FIP) e verificou-se que a infecção pelo FCoV está amplamente disseminada na população estudada. A presença dos anticorpos está acima da esperada para animais domiciliados, que segundo dados mundiais da literatura é de 30 a 50%. Não há dados disponíveis de estudos realizados no Brasil. (ADDIE e JARRETT, 2006; BROWN et al., 2009; PEDERSEN, 2009).

Com relação à faixa etária foi coletado um número maior de animais filhotes (1 a 12 meses), representando 46,36% do total. A idade é considerada como um importante fator de risco para o desenvolvimento da PIF (HARTMANN, 2005; HORZINEK et al., 2008). Os gatos podem se infectar com o FCoV em todas as faixas etárias, porém os que possuem o maior risco de desenvolver a doença são os animais na idade de três meses a três anos (filhotes e jovens). Os gatos idosos com mais de 10 anos também são considerados animais de alto risco, devido ao declínio do seu sistema imunológico (ROHRBACH et al., 2001; ADDIE & JARRETT, 2006). Foi demonstrado pelas análises estatísticas que os animais adultos apresentam maior chance de serem soropositivos quando comparados com filhotes. E quando analisados em grupos (filhotes/jovens e adultos/idosos), o grupo dos adultos e idosos também tem maior chance de ter anticorpos anti-FCoV. AKKAN & KARACA (2009), em um estudo de soroprevalência também encontraram maior soropositividade nos adultos e idosos. Estes animais possivelmente por terem maior idade, possuem assim, maiores chances de entrar em contato com o vírus e produzir anticorpos.

No presente estudo, 73,51% dos animais eram SRD, e não foram encontradas diferenças estatísticas com as raças analisadas, possivelmente pelo baixo número de animais amostrados de determinadas raças. Todas as raças de gatos podem se infectar com o FCoV e os animais desenvolver a PIF, mas para alguns gatos de raça pura parece haver uma predisposição genética ao desenvolvimento da doença na forma sistêmica (HORZINEK et al., 2008). Algumas raças são citadas, como o Abissínio, Bengal, Birmanês, Himalaio, Ragdoll, Rexes, Burmês, Exótico Shorthair, Manx, Persa, Azul Russo (Russian Blue) e Siamês (MALIK & NORRIS, 2006; PESTEANU-SOMOGYI et al., 2006; HORZINEK et al., 2008). O aumento da prevalência da doença para estas raças puras pode ser devido à concentração de fatores hereditários, obtidos através de cruzamentos consanguíneos (FOLEY & PEDERSEN, 1996).

Em relação ao gênero, 51,65% eram machos e 48,35% eram fêmeas. Quanto à soropositividade não foram encontradas diferenças estatísticas entre eles, corroborando com dados do estudo de MALIK e NORRIS, 2006. Alguns estudos demonstraram uma maior predisposição para o desenvolvimento da PIF em gatos machos (ROBISON et al., 1971; ROHRBACH et al., 2001; PESTEANU-SOMOGYI et al., 2006). Para a condição reprodutiva do total de animais amostrados 74,83% eram castrados, e destes animais 43,71% apresentaram resultado positivo no teste. Para os animais inteiros a soropositividade foi de 20,53%. As análises estatísticas demonstraram que animais inteiros tem 2,76 vezes mais chances de serem soropositivos quando comparados com animais castrados. Alguns autores descreveram um maior risco para o desenvolvimento da doença em gatos inteiros (ROBISON et al., 1971; ROHRBACH et al., 2001; PESTEANU-SOMOGYI et al., 2006; WORTHING et al., 2012). Gatos machos e inteiros tendem a sair mais para a rua se houver oportunidade, sendo assim, submetidos a um maior estresse por brigas (disputa de território e fêmeas) podendo ficar mais vulnerável ao desenvolvimento da PIF, além de aumentar as chances destes animais entrarem em contato com uma maior variabilidade de cepas do FCoV.

Para o modo de criação, 91,39% viviam em grupo de 2 a 10 gatos. Ambientes com múltiplos gatos parecem ser de maior risco para o desenvolvimento da doença, sendo a prevalência da infecção alta em casas com vários co-habitantes (ADDIE & JARRET, 2006). Dado que a maior parte dos gatos deste estudo viviam em ambientes com outros felinos, não foram encontradas diferenças estatísticas para este fator de risco nesta população. Para o acesso à rua foram encontradas diferenças estatísticas, onde animais sem acesso têm 4 vezes mais chances de serem soropositivos quando comparados com animais que tem acesso. Gatos sem acesso à rua passam a maior parte do tempo confinados sendo expostos constantemente a grandes quantidades de agentes infecciosos, principalmente em ambientes onde há mais de um gato. Mudanças no manejo dos gatos domésticos também tem contribuído para uma maior disseminação destes agentes, como por exemplo, a introdução da vasilha sanitária, onde estes gatos acabam sendo expostos a grandes quantidades de FCoV nas fezes diariamente (ADDIE & JARRET, 2006). Estes animais tem possivelmente contato com uma menor variabilidade de cepas do FCoV, e o manejo (limpeza e desinfecção, o não acúmulo de animais em um único ambiente) realizado por seus proprietários é de fundamental importância para prevenção do desenvolvimento da PIF.

## **CONCLUSÃO**

O estudo soropidemiológico 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 nos fatores de risco faixa etária, condição reprodutiva e acesso à rua ajudam a traçar um perfil epidemiológico desta população.

## **COMITÊ DE ÉTICA E BIOSSEGURANÇA**

Este trabalho foi submetido e aprovado pelo comitê de ética desta faculdade (CEUA), com o n° do protocolo 51/2014.

## **AGRADECIMENTO(S)**

A Fapesp pela concessão da bolsa (processo Fapesp 2014/02994-6).

## **REFERÊNCIAS**

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.

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.

BROWN, M. A. et al. Genetics and pathogenesis of feline infectious peritonitis virus. *Emerging Infectious Diseases*, v.15, p.1445- 1452, 2009.

CORNELISSEN, E. et al. 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.

FOLEY, J.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. et al. 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, 1997.

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

HORZINEK, M. et al. 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

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.

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

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

ROBISON, R.L. et al. 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. et al. 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.

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.

WORTHING, K.A. et al. Risk factors for feline infectious peritonitis in Australian cats. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, v.14, n.6, p. 405–412, 2012.

## ANEXO I

| ID amostra | ImmunoComb FCoV<br>(A) | ELISA indireto (D.O. A <sub>450</sub> )<br>(B) | Resultado<br>(A) | Resultado<br>(B) |
|------------|------------------------|--|------------------|------------------|
| 1          | S4                     | 0,040  | P                | N                |
| 2          | S3                     | 0,087  | P                | N                |
| 3          | S4                     | 0,223  | P                | P                |
| 4          | S4                     | 0,372  | P                | P                |
| 5          | S0                     | 0,115  | N                | N                |
| 6          | S0                     | 0,180  | N                | P                |
| 7          | S3                     | 0,270  | P                | P                |
| 8          | S3                     | 0,224  | P                | P                |
| 9          | S0                     | 0,064  | N                | N                |
| 10         | S0                     | 0,073  | N                | N                |
| 11         | S0                     | 0,032  | N                | N                |
| 12         | S5                     | 1,440  | P                | P                |
| 13         | S3                     | 0,230  | P                | P                |
| 14         | S4                     | 0,538  | P                | P                |
| 15         | S4                     | 0,711  | P                | P                |
| 16         | S5                     | 1,520  | P                | P                |
| 17         | S4                     | 0,512  | P                | P                |
| 18         | S4                     | 1,507  | P                | P                |
| 19         | S4                     | 1,572  | P                | P                |
| 20         | S4                     | 0,580  | P                | P                |
| 21         | S0                     | 0,050  | N                | N                |
| 22         | S0                     | 0,128  | N                | N                |
| 23         | S4                     | 1,304  | P                | P                |
| 24         | S3                     | 0,097  | P                | N                |
| 25         | S4                     | 0,158  | P                | P                |
| 26         | S5                     | 1,079  | P                | P                |
| 27         | S1                     | 0,112  | N                | N                |
| 28         | S4                     | 0,844  | P                | P                |
| 29         | S3                     | 0,132  | P                | N                |
| 30         | S1                     | 0,162  | N                | P                |
| 31         | S5                     | 1,146  | P                | P                |
| 32         | S5                     | 0,565  | P                | P                |
| 33         | S0                     | 0,075  | N                | N                |
| 34         | S4                     | 0,991  | P                | P                |
| 35         | S4                     | 0,680  | P                | P                |
| 36         | S4                     | 0,342  | P                | P                |
| 37         | S4                     | 0,971  | P                | P                |
| 38         | S4                     | 0,144  | P                | N                |
| 39         | S4                     | 0,655  | P                | P                |
| 40         | S1                     | 0,088  | N                | N                |
| 41         | S0                     | 0,183  | N                | P                |

| <b>ID amostra</b> | <b>ImmunoComb FCoV<br/>(A)</b> | <b>ELISA indireto (D.O. A<sub>450</sub>)<br/>(B)</b> | <b>Resultado<br/>(A)</b> | <b>Resultado<br/>(B)</b> |
|-------------------|--------------------------------|--|--------------------------|--------------------------|
| 42                | S2                             | 0,027  | P                        | N                        |
| 43                | S5                             | 0,869  | P                        | P                        |
| 44                | S5                             | 0,973  | P                        | P                        |
| 45                | S4                             | 0,731  | P                        | P                        |
| 46                | S4                             | 0,371  | P                        | P                        |
| 47                | S4                             | 1,061  | P                        | P                        |
| 48                | S4                             | 0,829  | P                        | P                        |
| 49                | S5                             | 0,891  | P                        | P                        |
| 50                | S5                             | 1,001  | P                        | P                        |
| 51                | S5                             | 0,710  | P                        | P                        |
| 52                | S4                             | 0,759  | P                        | P                        |
| 53                | S5                             | 1,108  | P                        | P                        |
| 54                | S5                             | 1,032  | P                        | P                        |
| 55                | S4                             | 0,318  | P                        | P                        |
| 56                | S4                             | 0,490  | P                        | P                        |
| 57                | S0                             | 0  | N                        | N                        |
| 58                | S0                             | 0  | N                        | N                        |
| 59                | S4                             | 1,051  | P                        | P                        |
| 60                | S4                             | 0,884  | P                        | P                        |
| 61                | S5                             | 1,372  | P                        | P                        |
| 62                | S5                             | 1,118  | P                        | P                        |
| 63                | S4                             | 0,853  | P                        | P                        |
| 64                | S3                             | 0,182  | P                        | P                        |
| 65                | S4                             | 0,407  | P                        | P                        |
| 66                | S4                             | 0,419  | P                        | P                        |
| 67                | S3                             | 0,108  | P                        | N                        |
| 68                | S2                             | 0,088  | P                        | N                        |
| 69                | S5                             | 1,158  | P                        | P                        |
| 70                | S4                             | 0,908  | P                        | P                        |
| 71                | S4                             | 0,682  | P                        | P                        |
| 72                | S5                             | 1,327  | P                        | P                        |
| 73                | S5                             | 1,352  | P                        | P                        |
| 74                | S4                             | 1,015  | P                        | P                        |
| 75                | S4                             | 0,499  | P                        | P                        |
| 76                | S4                             | 0,748  | P                        | P                        |
| 77                | S5                             | 1,241  | P                        | P                        |
| 78                | S4                             | 0,921  | P                        | P                        |
| 79                | S4                             | 0,265  | P                        | P                        |
| 80                | S1                             | 0,025  | N                        | N                        |
| 81                | S1                             | 0  | N                        | N                        |
| 82                | S2                             | 0  | P                        | N                        |
| 83                | S3                             | 0,125  | P                        | N                        |
| 84                | S1                             | 0  | N                        | N                        |

| <b>ID amostra</b> | <b>ImmunoComb FCoV<br/>(A)</b> | <b>ELISA indireto (D.O. A<sub>450</sub>)<br/>(B)</b> | <b>Resultado<br/>(A)</b> | <b>Resultado<br/>(B)</b> |
|-------------------|--------------------------------|--|--------------------------|--------------------------|
| 85                | S0                             | 0  | N                        | N                        |
| 86                | S2                             | 0,153  | P                        | P                        |
| 87                | S0                             | 0,012  | N                        | N                        |
| 88                | S5                             | 0,676  | P                        | P                        |
| 89                | S0                             | 0,096  | N                        | N                        |
| 90                | S5                             | 0,777  | P                        | P                        |
| 91                | S5                             | 1,014  | P                        | P                        |
| 92                | S5                             | 1,157  | P                        | P                        |
| 93                | S3                             | 0,391  | P                        | P                        |
| 94                | S0                             | 0,223  | N                        | P                        |
| 95                | S4                             | 0,932  | P                        | P                        |
| 96                | S4                             | 0,578  | P                        | P                        |
| 97                | S0                             | 0  | N                        | N                        |
| 98                | S0                             | 0  | N                        | N                        |
| 99                | S4                             | 0,865  | P                        | P                        |
| 100               | S1                             | 0,045  | N                        | N                        |
| 101               | S1                             | 0,099  | N                        | N                        |
| 102               | S0                             | 0,152  | N                        | N                        |
| 103               | S0                             | 0,012  | N                        | N                        |
| 104               | S0                             | 0,003  | N                        | N                        |
| 105               | S0                             | 0,012  | N                        | N                        |
| 106               | S0                             | 0  | N                        | N                        |
| 107               | S0                             | 0  | N                        | N                        |
| 108               | S0                             | 0  | N                        | N                        |
| 109               | S2                             | 0,052  | P                        | N                        |
| 110               | S3                             | 0  | P                        | N                        |
| 111               | S4                             | 0,807  | P                        | P                        |
| 112               | S0                             | 0,018  | N                        | N                        |
| 113               | S0                             | 0,011  | N                        | N                        |
| 114               | S0                             | 0,022  | N                        | N                        |
| 115               | S0                             | 0,003  | N                        | N                        |
| 116               | S4                             | 0,381  | P                        | P                        |
| 117               | S4                             | 0,602  | P                        | P                        |
| 118               | S3                             | 0,343  | P                        | P                        |
| 119               | S3                             | 0,283  | P                        | P                        |
| 120               | S0                             | 0  | N                        | N                        |
| 121               | S0                             | 0,103  | N                        | N                        |
| 122               | S0                             | 0,025  | N                        | N                        |
| 123               | S0                             | 0,065  | N                        | N                        |
| 124               | S1                             | 0  | N                        | N                        |
| 125               | S0                             | 0,013  | N                        | N                        |
| 126               | S1                             | 0,020  | N                        | N                        |

| <b>ID amostra</b> | <b>ImmunoComb FCoV<br/>(A)</b> | <b>ELISA indireto (D.O. A<sub>450</sub>)<br/>(B)</b> | <b>Resultado<br/>(A)</b> | <b>Resultado<br/>(B)</b> |
|-------------------|--------------------------------|--|--------------------------|--------------------------|
| 127               | S1                             | 0,148  | N                        | N                        |
| 128               | S4                             | 0,021  | P                        | N                        |
| 129               | S1                             | 0,010  | N                        | N                        |
| 130               | S2                             | 0,027  | P                        | N                        |
| 131               | S0                             | 0,038  | N                        | N                        |
| 132               | S0                             | 0,036  | N                        | N                        |
| 133               | S0                             | 0,034  | N                        | N                        |
| 134               | S0                             | 0  | N                        | N                        |
| 135               | S0                             | 0,124  | N                        | N                        |
| 136               | S5                             | 1,080  | P                        | P                        |
| 137               | S4                             | 0,414  | P                        | P                        |
| 138               | S4                             | 1,054  | P                        | P                        |
| 139               | S5                             | 1,431  | P                        | P                        |
| 140               | S0                             | 0,019  | N                        | N                        |
| 141               | S1                             | 0,059  | N                        | N                        |
| 142               | S4                             | 0,756  | P                        | P                        |
| 143               | S4                             | 0,650  | P                        | P                        |
| 144               | S4                             | 0,607  | P                        | P                        |
| 145               | S0                             | 0,142  | N                        | N                        |
| 146               | S0                             | 0,080  | N                        | N                        |
| 147               | S4                             | 0,361  | P                        | P                        |
| 148               | S4                             | 0,390  | P                        | P                        |
| 149               | S4                             | 0,420  | P                        | P                        |
| 150               | S5                             | 0,655  | P                        | P                        |
| 151               | S4                             | 0,356  | P                        | P                        |

\* P: positivo e N: negative.