



**UNIVERSIDADE FEEVALE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIROLOGIA
MESTRADO EM VIROLOGIA**

DANIELA SAUL FRIEDRICH

**CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA E EPIDEMIOLÓGICA DO CALICIVÍRUS FELINO,
REGIÃO METROPOLITANA DO RIO GRANDE DO SUL**

NOVO HAMBURGO

2021



**UNIVERSIDADE FEEVALE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIROLOGIA
MESTRADO EM VIROLOGIA**

DANIELA SAUL FRIEDRICH

**CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA E EPIDEMIOLÓGICA DO CALICIVÍRUS FELINO,
REGIÃO METROPOLITANA DO RIO GRANDE DO SUL**

Dissertação apresentada ao
Mestrado Acadêmico em Virologia
como requisito para a obtenção do
título de Mestre em Virologia.

Orientador: Prof. Dr^a Andréia Henzel

Co-orientador: Prof. Dr. David Driemeier

NOVO HAMBURGO

2021

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)

Friedrich, Daniela Saul.

Caracterização clínica e epidemiológica do calicivírus felino, região metropolitana do Rio Grande do Sul / Daniela Saul Friedrich. – 2021.

48 f.; il. color. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado Acadêmico em Virologia) – Universidade Feevale, Novo Hamburgo-RS, 2021.

Inclui bibliografia e anexos.

“Orientador: Prof. Dr^a Andréia Henzel ; Co-orientador: Prof. Dr. David Driemeier”.

1. FCV. 2. IHQ. 3. RT-PCR. 4. Epidemiologia. I. Título.

CDU 616-036.22

Bibliotecária responsável: Bruna Heller – CRB 10/2348



**UNIVERSIDADE FEEVALE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIROLOGIA
MESTRADO EM VIROLOGIA**

DANIELA SAUL FRIEDRICH

**CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA E EPIDEMIOLÓGICA DO CALICIVÍRUS FELINO,
REGIÃO METROPOLITANA DO RIO GRANDE DO SUL**

Dissertação de Mestrado aprovada pela banca examinadora em 30 de abril de 2021,
conferindo ao autor o título de Mestre em Virologia.

Componentes da Banca Examinadora:

Prof. Dr^a. Andréia Henzel (Orientador)
Universidade Feevale

Prof. Dr^a. Simone Ulrich Picoli
Universidade Feevale

Prof. Dr^a. Luciana Sonne
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

AGRADECIMENTO

Agradeço a todos que me auxiliaram nessa caminhada, minha família, mãe, irmãos, Alexandre, colegas da Feevale, especialmente aos colegas de laboratório.

Aos colegas da UFRGS, Fernando e Cíntia, co-orientador prof^o David Driemeier, professores da Feevale, colegas de clínica, colegas da delegacia, colaboradora Rochana, a todos meu muito obrigada.

À minha professora querida e dedicada, Andréia Henzel, além de orientadora foi meu norte, obrigada por apostar em mim e acreditar que era possível. Tivemos obstáculos, mas tu me mostraste que quando queremos é possível. Te adoro!

Dedico esse trabalho ao meu pai, a quem devo o que sou hoje, e foi quem me ensinou o valor dos estudos, do trabalho e da honestidade. Sei que onde estiveres sempre estarás olhando por mim, e sei que estás orgulhoso desse trabalho. Te amo!

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
1.1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	11
1.1.1 Prevalência de felinos no Brasil e mundo.....	11
1.1.2 Doença do trato respiratório dos felinos	11
1.1.3 Gengivo-estomatites crônica felina.....	12
1.1.4 Calicivírus felino.....	14
1.1.5 Vacinação	15
2 OBJETIVOS	17
2.1 Objetivo geral.....	17
2.2 Objetivos específicos	17
3 MATERIAL E MÉTODOS UTILIZADOS	18
3.1 Amostragem.	18
3.2 Descrição clínico-epidemiológica.....	19
3.3 Imuno-histoquímica.....	19
3.4 Detecção viral	20
3.4.1 Extração do genoma viral	20
3.4.2 Amplificação do genoma viral.....	21
3.5 Sequenciamento genético e filogenia.....	21
4 RESULTADOS	23
4.1 Amostragem.....	23
4.2 Descrição clínica, epidemiológica e virológica.....	23
4.3 Imuno-histoquímica.....	25
5 DISCUSSÃO	27
6 CONCLUSÃO	32
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33
8 ANEXOS	41

RESUMO

Calicivírus felino (*feline calicivirus* – FCV) é um vírus de distribuição mundial que acomete membros da família *Felidae*. O FCV é considerado um dos principais agentes das complicações do trato respiratório dos felinos. Além das doenças respiratórias, lesões orais como gengivostomatite, claudicação e a síndrome sistêmica - FCV-VSD (*feline calicivirus – virulent systemic disease*) são associados à infecção pelo FCV. O presente trabalho tem como objetivo caracterizar o perfil clínico-epidemiológico dos felinos infectados pelo FCV; caracterizar geneticamente os isolados de FCV e realizar imuno-histoquímica (IHQ) para FCV em blocos de parafina. Os blocos são tecidos de felinos acometidos por granuloma eosinofílico (provenientes do acervo do Setor de Patologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2006 a 2010). *Swabs* nasal/oral e/ou ocular de felinos com ou sem manifestação clínica sugestivo da infecção pelo FCV foram coletadas, e o perfil epidemiológico das amostras coletas foi classificado em: sexo, idade, *status* vacinal, sinais clínicos e tipo de convívio. As amostras foram submetidas a extração de RNA genômico, síntese de cDNA e em seguida a RT-PCR foi realizada para detecção do FCV. O gene-alvo da reação foi a ORF2 (*open reading frame*) por ser esse o gene que codifica as regiões imunodominantes do FCV, sujeitas a variabilidade genética e são sítios indutores de anticorpos neutralizantes. Foram coletadas 70 amostras de *swabs*, entre nasais, orais e oculares, sendo que destas: 59% (41/70) foram provenientes de machos e 41% (29/70) fêmeas; e a faixa etária de 1 a 5 anos foi a mais frequente, correspondendo a 54% (38/70) das amostras analisadas. Quando se avaliou o *status* vacinal dos felinos, 45% dos animais coletados eram vacinados para FCV; 41% dos animais tinham acesso à rua, e 18 dos 70 animais apresentam sinais clínicos sugestivos da infecção pelo FCV. Três das 70 amostras foram positivas para o FCV. Os felinos positivos para o FCV apresentaram desde secreções oculares, nasais, espirros a lesões orais, sendo que um deles foi previamente detectado a co-infecção por parvovírus e coronavírus felino. O produto de PCR desses animais será sequenciado para análise genética. Para realizar a IHQ foram analisados 22 blocos de parafina, porém, o FCV não foi detectado. Potencialmente os isolados da região metropolitana do RS entre 2019-2020, assim que analisados geneticamente, provavelmente irão apresentar diversidade molecular quando comparados a cepas de referências, as vacinais e as descritas na região central do RS - 2006 a 2010. Além disso, os resultados obtidos tanto quanta a presença do FCV como a análise do perfil clínico-epidemiológico dos felinos da região, poderão contribuir para dados sobre a população felina na região, majoritariamente, quanto ao *status*

sanitário para um dos principais agentes virais que acometem o trato respiratório dos felinos, o FCV.

PALAVRAS-CHAVES: FCV, IHQ, RT-PCR, epidemiologia.

ABSTRACT

Feline calicivirus (FCV) is a virus with worldwide distribution that affects members of the Felidae family. FCV is considered one of the main agents of feline respiratory tract complications. In addition to respiratory diseases, oral lesions such as gingival stomatitis, lameness and the systemic syndrome - FCV-VSD (feline calicivirus - virulent systemic disease) are associated with FCV infection. In this work, we aim to characterize the clinical-epidemiological profile of felines infected by FCV; genetically characterize the FCV detected in the analyzed cats and perform immunohistochemistry (IHC) for FCV in paraffinized blocks. These blocks are from feline tissues affected by eosinophilic granuloma (from the collection of the Pathology Sector of the Federal University of Rio Grande do Sul, 2006 to 2010). Nasal / oral and / or ocular swabs from felines with or without clinical manifestation suggestive of FCV infection were collected, and the epidemiological profile of the collected samples was classified into: sex, age, vaccination status, clinical signs and type of interaction. The samples were subjected to genomic RNA extraction, cDNA synthesis and then RT-PCR was performed to detect FCV. The target gene for the reaction was ORF2 (open reading frame) because this is the gene that encodes the immunodominant regions of FCV, which are subject to genetic variability and are sites that induce neutralizing antibodies. Seventy swab samples were collected, between nasal, oral and ocular, of which: 59% (41/70) came from males and 41% (29/70) females; the age group from 1 to 5 years old being the most prevalent, corresponding to 54% (38/70) of the analyzed samples. When considering the feline vaccine status, 45% of the animals collected were vaccinated for FCV; 41% of the animals had access to the street, and 18 of the 70 animals show clinical signs suggestive of FCV infection. Three of the 70 samples analyzed were positive at FCV. The felines positive for FCV presented from ocular, nasal secretions, sneezing to oral lesions, one of which was previously detected with co-infection by feline parvovirus and coronavirus. The PCR product of these animals will be sequenced for genetic analysis. Twenty two paraffin block samples were analyzed, however FCV was not detected. It is believed that isolates from the metropolitan region of RS between 2019-2020, as soon as analyzed at the genetic level, will potentially present molecular diversity when compared to reference vaccine strains and those described in the central region of RS, a study between 2006 and 2010. In addition, the results obtained both in terms of the presence of FCV and the analysis of the clinical-epidemiological profile of felines in the region, may contribute to data on the feline population in the region, mainly, regarding the health status for

one of the main viral agents that affect the disease. respiratory tract of felines, which is the FCV.

KEY-WORDS: FCV, IHQ, RT-PCR, epidemiology.

1 INTRODUÇÃO

Na atualidade a população dos felinos no nosso país e no mundo vem crescendo progressivamente, considerado hoje um dos setores da economia com impacto positivo e relevante destaque no PIB brasileiro. Sabe-se que a população de felinos domésticos do Brasil é a segunda maior do mundo, perdendo apenas para os Estados Unidos da América, estimando-se uma população de 24,7 milhões de felinos no nosso país, o que representa 11,1% de felinos nos lares domésticos. Esse crescimento é proporcionalmente estimulador no investimento nas empresas de alimentos, de insumos, nas *pet care*, nas *pet shop* e nas clínicas veterinárias (ABINPET, 2019).

As empresas responsáveis pela formulação de prevenção, como as vacinas, têm merecido importante destaque pelo controle das enfermidades infecciosas. Dentre as enfermidades virais infecciosas que merecem destaque estão as: enfermidades de transmissão iatrogênica – FIV (*feline immunodeficiency virus*) e FeLV (*feline leukemia virus*); e as enfermidades de transmissão oro-nasal – Calicivírus felino (*feline calicivirus* - FCV) e o Herpesvírus felino tipo- 1 (*felid herpesvirus type 1* - FeHV-1).

O agente viral que apresenta destaque é o FCV (RADFORD et al., 2009), devido grande procura de atendimento clínico, caráter epidemiológico, resistência ambiental, e constantes falhas vacinais reportadas. O FCV, FeHV-1, em conjunto com a *Bordetella bronchiseptica*, *Chlamydomphila felis* e *Mycoplasma felis* compreendem os agentes causadores das enfermidades do trato respiratório dos felinos conhecida como URTD (*upper respiratory tract disease*) ou infecção respiratória superior (*upper respiratory infection* – URI), porém, as infecções bacterianas são infecções de caráter secundário à infecção pelo FCV e/ou FeHV-1 (GASKELL & KNOWLES, 1989). Os estudos sobre a circulação e caracterização do FCV no estado do Rio Grande do Sul – RS se detém a poucos trabalhos, dentre eles: sorologia contra FCV em felinos selvagens e domésticos; isolamento do FCV; caracterização molecular do FCV, sendo o último trabalho realizado com a descrição clínico, patológica e molecular do FCV em quadros de gengivo-estomatite crônica dos felinos. A descrição atualizada das cepas virais de FCV que estão circulando no RS é de extrema importância para entendimento da evolução molecular do FCV, e, além disso, uma atualização das descrições clínico-epidemiológica e patológicas é importante para os médicos veterinários, pois o histórico das manifestações clínicas e lesões constatadas tem se modificado em virtude da adaptação viral, como já tem se observado para a parvovirose e cinomose canina.

1.1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1.1.1 PREVALÊNCIA DE FELINOS NO BRASIL E MUNDO

O Instituto Pet Brasil (2019), ao divulgar os dados atualizados sobre a população de animais de estimação em todo o território nacional, destaca o crescimento de casas que escolhem o gato como animal de estimação. No acumulado os felinos foram os animais que com maior taxa de aumento no país, com uma alta de 8,1% desde 2013. A maior concentração de gatos no país está nos estados de São Paulo (21,6%), Rio de Janeiro (9,1%), Minas Gerais (7,2%) e Rio Grande do Sul (7,2%). Segundo a COMAC (2020), mais da metade dos lares brasileiros possuem cães e/ou gatos, são mais de 80 milhões no País, que conta com a segunda população pet do mundo, ficando atrás apenas do Estados Unidos da América. A população felina apresenta um crescimento três vezes maior que a canina no país, sendo um exemplo disso o Nordeste, onde há uma predominância de gatos. Um dos possíveis motivos para isso, além do perfil do animal, é um custo mais baixo mensal, tornando possivelmente o gato um *pet* do futuro.

1.1.2 DOENÇA DO TRATO RESPIRATÓRIO DOS FELINOS

Doenças respiratórias infecciosas dos felinos se constituem em um problema frequente e de grande importância na medicina dos felinos (RADFORD et al., 2009; THIRY et al., 2009). O calicivírus felino (*feline calicivirus – FCV*) e o herpesvírus felino tipo 1 (*felid herpesvirus type 1 – FeHV-1*), juntamente com a *Bordetella bronchiseptica*, *Chlamydomphila felis* e *Mycoplasma felis*, podem causar URTD (*upper respiratory tract disease*) ou URI, infecção respiratória superior (*upper respiratory infection*); sendo as bactérias consideradas secundárias à infecção pelo FCV e/ou FeHV-1 (GASKELL & KNOWLES, 1989). Acredita-se que em torno de 80% dos casos sejam devidos a FeHV-1, FCV ou ambos. A síndrome URTD, FCV e FeHV-1 possuem igual importância (GASKELL & KNOWLES, 1989; HARBOUR et al., 1991; BINNS et al., 2000). O FCV é o agente etiológico mais frequente e o FHV-1 é o responsável pelas alterações clínicas mais graves, dependendo da estirpe de FCV envolvida (MURPHY et al., 1999; BINNS et al., 2000; CAI et al., 2002; BANNASCH & FOLEY, 2005; HELPS et al., 2005; GRACE, 2011; GASKELL et al., 2012). Esses vírus são espécie específico, logo, não possuem caráter zoonótico.

O FCV além de se atribuir a síndrome URTD, pode estar relacionado a infecções subclínicas ou crônicas; para o FCV faringites podem ser descritas, a doença oral crônica conhecida por complexo gengivo-estomatite linfoplasmocítica; manqueira ou claudicação; e a síndrome sistêmica altamente virulenta conhecida como VSD-FCV [*virulent systemic disease associated* – FCV] (BENNETT et al., 1989; PEDERSEN et al., 2000; RADFORD et al., 2009). A excreção viral termina ao fim de semanas a meses após a infecção com a exceção de alguns gatos em que persiste ao longo da vida (SYKES, 2014). De acordo com Coyne e colaboradores (2006a), gatos maiores de três anos tem menos probabilidade de eliminar FCV do que os abaixo dessa faixa etária. Entretanto, outros fatores como contínua exposição dos animais ao vírus ou a imunidade do animal podem estar envolvidos. Pode haver gatos infetados com diferentes variantes do FCV em simultâneo, cada uma derivada da estirpe infetante original, como resultado das mutações genéticas e pressões de seleção (SYKES, 2014). O isolamento viral de gatos clinicamente saudáveis é comumente reportado, pois, gatos recuperados clinicamente após infecção aguda podem tornar-se portadores (RADFORD et al., 2009).

Silva (2020) obteve dados que indicaram que o complexo respiratório felino tem maior predisposição em animais mais jovens, de até um ano, e sem raça definida, sendo esse último resultado pouco relevante, pois isso reflete apenas a proporção vista na população de gatos no Brasil, na qual animais sem definição de raça são vistos em maior quantidade (SOUZA; CALIXTO, 2003). Também sugeriu que não há predisposição significativa em relação ao sexo.

O FCV é mundialmente distribuído (HARBOUR et al., 1991; BINNS et al., 2000); mas no Brasil ainda pouco se conhece sobre sua distribuição e prevalência. No Brasil, o primeiro isolamento do FCV foi descrito em 1988 por Weiblen et al. (1988).

1.1.3 GENGIVO-ESTOMATITES CRÔNICA FELINA

A gengivo-estomatite crônica felina - FCG é uma debilitante condição oral felina caracterizada por doença crônica severa inflamação da gengiva, mucosa alveolar, lábio-bucal e mucosa oral caudal (HENNET et al. 2011; WINER et al., 2016). Lesões ulcerativas ou úlcero-proliferativas são frequentemente observadas. A ulceração da língua e do palato também pode estar presente. Além disso, o FCG demonstrou estar associado com periodontite mais amplamente distribuída e severa e com uma maior prevalência de reabsorção radicular inflamatória externa e raízes retidas que outras doenças orais (FARCAS et al., 2014). A presença de estomatite caudal distingue FCG de outras complicações orais felinas (HENNET,

1997; HENNET et al., 2011; FARCAS et al., 2014). A etiologia precisa da FCG ainda é incerta. Embora um grande número de fatores como doenças periodontais, predisposição genética e fatores alimentares possam estar relacionados com a manifestação da doença, os agentes infecciosos vêm sendo apontados como possíveis desencadeadores da FCG. Dentre os agentes infecciosos envolvidos no desenvolvimento da FCG, inclui-se o FCV, FIV, FeLV e FeHV-1 (LOMMER & VERSTRAETE, 2003). Todavia, todos esses agentes citados têm sido isolados não somente em felinos afetados com FCG, mas também em animais clinicamente saudáveis (QUIMBY et al., 2008; SYKES et al., 2010; DOLIESLAGER et al., 2013; HENZEL et al., 2012b).

A FCG caracteriza-se por lesão proliferativa e ulcerativa na cavidade oral observada principalmente no arco glossopalatino e na gengiva bucal, podendo afetar áreas como faringe, língua e lábios (BELLEI et al., 2008). O formato irregular da lesão torna difícil a delimitação entre o tecido sadio e o tecido alterado (LEIRIÃO-RIVA et al., 2004). As lesões inflamatórias crônicas presente em animais com FCG podem se estender pela cavidade oral chegando até a região do arco glossopalatino sendo então denominada de “estomatite caudal” (LOMMER et al., 2003; SOUTHERDEN et al., 2007). O complexo gengivite-estomatite é uma doença extremamente complexa, sem etiologia definida e sem tratamento definitivo eficaz (MATILDE et al., 2013).

Pesquisas tem relacionado agentes virais a FCG: 50% de animais com FCG foram positivos para o vírus da imunodeficiência felina (FIV) (HENNET, 2005). Correlacionou-se também, através da tecnologia do PCR de biópsias orais, gatos infectados com Calicivírus Felino (FCV) e com herpes vírus (FHV) e observou-se que 97% dos gatos com FCG eram infectados com Calicivírus Felino (FCV) e somente 15% destes eram infectados com Herpes Vírus (FHV) (HENNET, 2005).

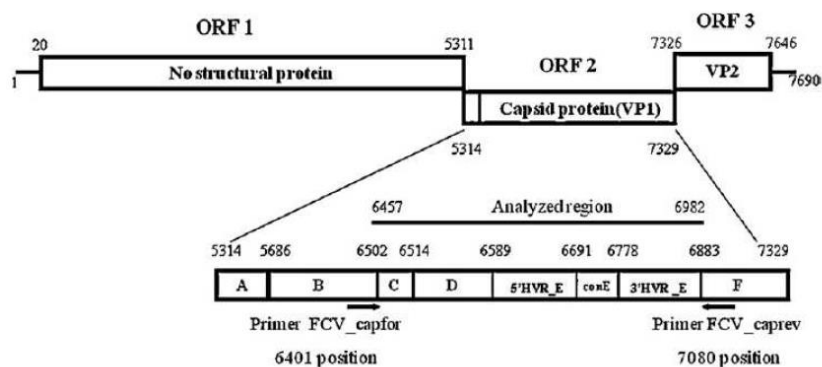
Clinicamente, observam-se lesões ulcerativas ou proliferativas nas regiões da faringe, arco glossopalatino, gengiva, mucosas alveolares, jugal e lingual. De acordo com a intensidade, tipo e proliferação da inflamação, a doença pode ser clinicamente classificada em quatro graus, de acordo com a extensão de área total acometida da cavidade oral, no qual 0 está relacionado à mucosa oral sem alteração; grau 1, discreta inflamação, com hiperemia marcante somente na área glossopalatina e pouco tecido proliferativo; grau 2, moderada inflamação, com extensão para as áreas gengivais dos dentes pré- molares inferiores e superiores, com hiperplasia gengival e tecido proliferativo e grau 3, intensa inflamação, com as lesões atingido todos os quadrantes da cavidade oral e formação intensa de tecido proliferativo ao redor dos dentes molares e pré- molares inferiores e superiores. Alguns animais demonstram-se tolerantes a dor mesmo

apresentando o estágio mais avançado da doença (WIGGS et al., 1997). A inflamação encontrada nos tecidos laterais estendendo-se até o arco glossopalatino e/ou na sobreposição da mucosa na área do pré-molar e molar estendendo-se até a área vestibular da mucosa, são as formas mais graves e mais difíceis de se tratar (HENNET et al., 2011).

1.1.4 CALICIVÍRUS FELINO

O FCV é um vírus RNA de cadeia simples (RNA *single strand*), não envelopado, pertence ao gênero *Vesivirus* da família *Caliciviridae* (RADFORD et al., 2009). O genoma do FCV (figura 1) apresenta um tamanho de aproximadamente 7,7 kb, e codifica três ORFs [*open reading frames*] (GREEN et al., 2000). A ORF 1 codifica as proteínas não-estruturais; a ORF 2 codifica a proteína do capsídeo, VP1 [*viral protein*], e a ORF 3 codifica a VP2 (SEAL et al., 1993; SOSNOVTSEV & GREEN, 2000; RADFORD, et al., 2009).

Figura 1: genoma do FCV.



Fonte: Adaptado de Henzel et al., 2012a.

A ORF2 é dividida em seis regiões (nomeadas de “A a F”) com base em sequências conservadas (NEIL, 1992; SEAL et al., 1993). A região E foi dividida em regiões hipervariáveis (*hypervariable* – HVR): 5’HVR_E e 3’HVR_E; separada por uma região conservada [conE] (SEAL et al., 1993). As regiões HVR contêm epítopos para os linfócitos B, tornando-se alvo para anticorpos neutralizantes; e podem ter função de evasão imune viral durante a infecção persistente no hospedeiro (TOHYA et al., 1997; GEISSLER et al., 2002; RADFORD et al., 2009). Epítopos conservados tem sido identificados dentro das regiões D e conE, mas seu papel na indução de anticorpos ainda é desconhecido (RADFORD et al., 2009).

O FCV assim como todo vírus RNA, apresenta altas taxas de mutação genômica, e assim responde rapidamente às pressões de seleção ambiental e imune do animal, dificultando o controle da infecção (RADFORD et al., 2009). Essa diversidade genética pode explicar as diferentes síndromes clínicas, a baixa eficácia vacinal, a dificuldade de induzir proteção vacinal cruzada, e, além disso, contribui para a infecção persistente no animal (LAURITZEN et al., 1997; KREUTZ et al., 1998; GLENN et al., 1999; RADFORD et al., 2009). A alta variabilidade pode contribuir ainda para a formação de cepas hipervirulentas e interferir no desenvolvimento de imunidade que confira proteção contra uma ampla variedade de cepas (RADFORD et al., 2007). No entanto, mesmo com essa variabilidade, os isolados de FCV pertencem ao mesmo genótipo e sorotipo (POULET et al., 2000; RADFORD et al., 2009).

A transmissão do FCV geralmente ocorre por contato direto entre gatos doentes ou persistentemente infectados (POVEY & JOHNSON, 1970; RADFORD, et al., 2009). O FCV entra pela via oronasal, conjuntival e orofaríngea, sendo o sítio orofaríngeo definido como o sítio primário da replicação do FCV. Transmissões indiretas também ocorrem, preferencialmente dentro de gatis onde a proximidade entre os animais facilita a transmissão. O médico veterinário ou o tutor como possível fonte de infecção entre felinos, pela transmissão via fômites, deve ser considerada. Em diferentes relatos, médicos veterinários e funcionários dos estabelecimentos veterinários carregaram o vírus para animais que manifestaram a enfermidade e vieram a óbito, o que pode estar relacionado a infecção por cepas carregadas nas roupas ou mãos de seus proprietários (DESCHAMPS et al., 2015; PEDERSEN et al., 2000; SCHORR-EVANS et al., 2003; SYKES, 2014). Esse fato deve servir de alerta para a descontaminação rigorosa de fômites e do ambiente, além da necessidade da utilização de luvas e outros materiais descartáveis pelas pessoas que estiveram em contato com animais possivelmente infectados. O FCV possui elevada resistência ambiental podendo permanecer infeccioso por até um mês em superfícies secas a temperatura ambiente, e por períodos maiores em condições de temperatura mais baixa e úmida (CLAY et al., 2006).

1.1.5 VACINAÇÃO

As vacinas contra FCV são do tipo vivas ou inativadas, e a inserção das vacinas nos calendários vacinais teve início na década de 70 (GASKELL & KNOWLES, 1989). As vacinas comercializadas mundialmente e aqui no Brasil são de aplicação parenteral. As vacinas em geral são seguras e efetivas em reduzir ou prevenir as doenças respiratórias/orais clássicas, embora

não previnam reinfecções e o estado de portador (RADFORD et al., 2009). A cepa amplamente utilizada nas vacinas é a FCV-F9, embora outras cepas de FCV como a FCV-F7 e FCV-255 são utilizadas (BAULCH-BROWN et al., 1999; RADFORD et al., 2009; OHE et al., 2007). Entretanto, falhas vacinais ocorrem e podem estar associadas com a preexistência do estado de portador, doença intercorrente e/ou interferência de imunidade passiva (HARBOUR et al., 1991). Normalmente as falhas vacinais relacionadas ao FCV estão relacionadas à sua diversidade antigênica (BAULCH-BROWN et al., 1999; SCHORR-EVANS et al., 2003); e a designação *vaccine breakdown strains* - VBS se atribui aos isolados associados às falhas vacinais (OHE et al., 2007).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral do presente trabalho foi caracterizar o perfil clínico e epidemiológico da população felina com e sem sinais clínicos sugestivos da infecção pelo FCV atendidos em clínicas veterinárias nos municípios da região metropolitana.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar o perfil clínico-epidemiológico dos felinos acometidos com infecção pelo FCV através dos dados obtidos nas fichas de atendimento;
- Identificar a presença de FCV por RT-PCR nas amostras coletadas de felinos clinicamente saudáveis e os com sinais clínicos sugestivos da infecção pelo FCV;
- Caracterizar o perfil genético e filogenético dos FCV detectados por RT-PCR;
- Detectar a presença da proteína do capsídeo do FCV por imuno-histoquímica em animais com granuloma eosinofílico (IHQ);
- Correlacionar a variabilidade genética dos isolados de FCV com isolados já descritos e com as cepas vacinais.

3 MATERIAL E MÉTODOS UTILIZADOS

3.1 AMOSTRAGEM

As amostras foram coletadas por duas Médicas Veterinárias: a) Rochana Rodrigues Fett doutoranda do PPG da UFRGS, a qual é colaboradora do projeto, e responsável pela triagem e pela anamnese dos animais que foram coletados na clínica Chatterie, e, b) Daniela Saul Friedrich, a qual realiza as coletas na Clínica Clinivet (figura 2), onde foi utilizado o mesmo protocolo da colaboradora do projeto. Esse projeto foi aprovado pelo comitê de ética (CEUA 03.19.078). Os termos de ciência dos tutores dos animais para a coleta foram assinados, incluindo a autorização da publicação dos dados resultantes do trabalho, e estão apresentados no anexo B.

Figura 2: Coleta de swab nasal de um felino em atendimento clínico.



Fonte: Autora.

Para a coleta das amostras, os felinos selecionados foram contidos, e posteriormente foi realizada a coleta de material através de *swabs* estéreis, podendo a via de coleta ser ocular, nasal e/ou oral. O material coletado foi acondicionado dentro de tubo eppendorf de reação com meio contendo antibiótico de enrofloxacina, o qual ficou refrigerado até a coleta do material. Após a coleta, o tubo com o meio e a amostra foram para o freezer -80°C até a extração do genoma viral ser realizada.

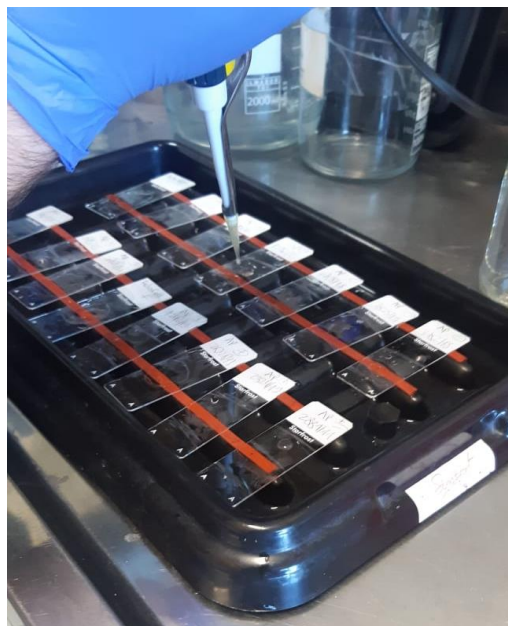
3.2 DESCRIÇÃO CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICA

Para atender os critérios epidemiológicos, foram analisadas as fichas de atendimento. Os seguintes critérios foram avaliados: idade, sexo, *status* vacinal, moradia (casa, apartamento e/ou acesso à rua/pátio), histórico clínico e descrição clínica quando houver. Foram coletados felinos clinicamente saudáveis (felinos que não apresentam sinais clínicos sugestivos da infecção pelo FCV), com manifestação clínica (respiratória e lesões orais) e/ou com histórico de manifestação respiratórias ou de lesões orais. Esses critérios de perfil clínico e epidemiológico foram cuidadosamente considerados, uma vez que além do propósito primordial do trabalho que foi detectar e caracterizar o FCV, o objetivo do trabalho também consiste em obter dados que subsidiam informações de natureza da população de felinos no RS, para comparar com os demais estados e/ou países.

3.3 IMUNO-HISTOQUÍMICA

Foram selecionadas no acervo do laboratório do setor de patologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul 22 amostras de tecidos coletados de felinos com variações clínicas/epidemiológicas e com lesões granulomatosas na região oral. A imuno-histoquímica (IHQ) destas amostras foram realizadas (figura 3), porém, em 06 amostras o material foi insuficiente para análise.

Figura 3: Realização da técnica de Imuno-histoquímica.



Fonte: Autora.

O anticorpo monoclonal utilizado na IHQ foi o anti-FCV (FCV2-16), o código FCV2-16 (Customon Monoclonal International), a recuperação antigênica 10min/37°C Protease XIV (Sigma), a diluição 1:50, o método de detecção MACH 4 (Biocare Medical), e o cromógeno AEC (Dako). A técnica de IHQ seguiu o protocolo padronizado por Rolim et al., (2016).

Controles positivos foram inseridos simultaneamente com as lâminas testadas, consistindo de casos positivos do FCV testados anteriormente. Controles negativos consistiam de secções de tecido incubadas com PBS ao invés do anticorpo primário.

O controle positivo da FCV foi obtido através da inoculação da cepa viral contida na vacina comercial Felocell CVR-C (Pfizer Animal Health, EUA) em células CRFK (*Crandell-Reese feline kidney*). As células permaneceram incubadas em estufa a 37°C até o aparecimento do efeito citopático. A solução contendo células infectadas foi centrifugada a 800 rpm durante 5 minutos, até a formação do “pellet” celular. O sobrenadante foi desprezado. O “pellet” celular foi então fixado com etanol 96% durante cinco minutos e novamente centrifugado a 800 rpm durante cinco minutos. O sobrenadante foi desprezado. O pellet fixado de células foi incluído na solução gelatinosa de Histogel (ThermoScientific, EUA) e processado rotineiramente para histologia. Uma cultura de células CRFK não inoculada foi usada como controle negativo para a padronização de IHQ.

3.4 DETECÇÃO VIRAL

3.4.1 EXTRAÇÃO DO GENOMA VIRAL

Para a extração do genoma do FCV, RNA, foi utilizado Trizol, e a partir de um volume inicial de 750µL de Trizol para 250µL de amostra, conforme protocolo descrito pelo fabricante. A mistura foi homogeneizada com a pipeta, em seguida incubada em temperatura ambiente por 5 minutos, o que garantiu a dissociação completa do complexo de microproteínas em seguida foi centrifugado por 5 minutos 12000g a 4-10°C. Na sequência o sobrenadante foi transferido para um novo tubo, e foi adicionado 200µL de clorofórmio para cada ml de Trizol, e após, o mesmo foi homogenizado. A mistura foi incubada por 2-3 minutos, e em seguida, centrifugada por 15 minutos a 10700rpm e 4°C. A mistura separou-se em um fenol-clorofórmio vermelho inferior, uma interfase e uma fase aquosa superior incolor. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo, pois continha RNA. Adicionou-se 500µL de isopropanol a fase aquosa. A mistura foi incubada por 10 minutos, e, em seguida, centrifugada por 10 minutos a 12000g e

4°C. Foi formado um precipitado total de RNA cuja aparência é um sedimento branco semelhante a um gel, e encontra-se no fundo do tubo. O sobrenadante foi descartado. O sedimento de RNA foi ressuspensionado em 1mL de etanol 75%. A mistura foi homogenizada com uma pipeta e centrifugada por 5 minutos a 8500rpm e 4°C. O sobrenadante foi descartado. Os tubos ficaram secando até evaporar todo etanol. O sedimento foi resuspensionado em 20-50µL de água livre de RNase. A eluição final foi realizada em microtubos livres de DNase/RNase, onde os mesmos ficaram armazenados e mantidos à -80 °C até posterior amplificação.

3.4.2 AMPLIFICAÇÃO DO GENOMA VIRAL

As amostras são testadas por RT-PCR. O RNA foi submetido a síntese do cDNA, 20µL de solução total contendo o seguinte: 2 µL de RNA (aproximadamente 100 ng), 100 ng de *primers* randômico, *buffer* 1X da transcriptase reversa (RT), MgCl₂ 25 mM, dNTPs 10 mM, DTT 0,1 mM, 40 U RNaseOUT e 200 U RT (SuperScript™ III RT - Invitrogen). A solução foi incubada a 65°C durante 5 min, 25°C durante 10 min, 42°C durante 50 min e 85°C durante 5 min. O cDNA foi utilizado como molde para a PCR para identificação do FCV.

A ORF2 (regiões B a F), foi a região alvo para amplificação do cDNA do FCV. O produto amplificado resultou em um fragmento de 955 pb (pares de bases). As sequências dos *primers* são 8F (*forward*) 5' - CACSTTATGTCYGACACTGA - 3' (posição 6142 da região B da ORF2) e 8R (*reverse*) 5' - CTRGADGTRTGCARRATTT - 3' (posição 7097 da região F da ORF2), baseado na cepa FCV-F9 (número de acesso no *GenBank* M86379). Os *primers* utilizados foram degenerados, e as letras S, Y, R e D referem-se a C / G, T / C, A / G e A / C / T, respectivamente, e foram previamente desenvolvidas por Ohe et al., (2006), e o mesmo set de *primers* já tem sido utilizado por Henzel et al. (2012b). As condições de PCR usadas foram: 94 ° C por 5 min para a desnaturação inicial, seguido por 35 ciclos de três etapas de 94°C por 45 s, 48 ° C por 45 s, 72°C por 45 s e uma extensão final de 7 min a 72°C. Os produtos de PCR resultantes foram submetidos a eletroforese em gel de agarose e visualizados sob luz UV. Uma vacina comercial viva atenuada - Felocell CVR-C (Pfizer Animal Health, EUA), foi utilizada como controle positivo em todas as reações.

3.5 SEQUENCIAMENTO GENÉTICO E FILOGENIA

As amostras positivas para FCV na RT-PCR seriam purificadas utilizando o kit - *QiaQuick DNA purification kit* (Qiagen) e em seguida seriam enviadas para o sequenciamento

(laboratório externo). Para análise das sequências é utilizado um novo *set* de primers: FCV Capfor 5' -TTCGGCCGTTTGTCTTCC-3' [posição 6401–6419 (região B da ORF2)] e FCV Caprev 5' -TTGTGAATTAAAGACATCAATAGACCT-3' [posição 7080–7053 (região F da ORF2)] (Henzel et al, 2012a). Este novo set de primers é conservado e corresponde a posições mais internas a região previamente amplificada pelo 8F e 8R (955 pb) podendo resultar em uma leitura de 679 pb.

A análise filogenética é realizada através da comparação das sequências genômicas obtidas através do sequenciamento direto do DNA com outros fragmentos de nucleotídeos disponíveis no *GenBank* e com as cepas vacinas do FCV de acordo com a metodologia de Neighbor-Joining (SAITOU & NEI, 1987). Após a árvore filogenética é elaborada a partir do cálculo das distâncias evolutivas, utilizando o método Kimura- parâmetro 2 (KIMURA, 1980), e operando com o software *Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0* (MEGA 7.0) (KUMAR et al., 2016). A robustez da inferência filogenética é avaliada através do método de *boots traping* (com base em 1000 réplicas). As sequências, após analisadas, que atendam às exigências do banco de dados genômico, são submetidas para depósito no *GenBank*. Devido à diversas intercorrências durante o trabalho, a etapa do sequenciamento genético e filogenia não foram concluídas.

4 RESULTADOS

4.1 AMOSTRAGEM

Foram coletadas 70 amostras de felinos provenientes da região metropolitana do RS, de diferentes características clínico-epidemiológica, sendo três felinos com resultado positivo para o FCV, conforme tabela 1.

Tabela 1: características clínico-epidemiológicas dos felinos coletados.

Dados Epidemiológicos	Felinos coletados
Idade (anos)	
< 1 ano	12
1 – 5 anos	38
5 – 10 anos	10
> 10 anos	10
Sexo	
Fêmea	29
Macho	41
Status vacinal	
Vacinado	32
Não-vacinado	30
Não informado	08
Acesso à rua	
Sim	29
Não	19
Não informado	22
Presença ou ausência de sinal clínico	
Com sinal clínico	18
Sem sinal clínico	52
Positivo FCV	03
Negativo FCV	67
Total	70

Fonte: Autora.

4.2 DESCRIÇÃO CLÍNICA, EPIDEMIOLÓGICA E VIROLÓGICA

Três felinos foram positivos para o FCV pela RT-PCR, nenhum deles era vacinado, totalizando 4,3% de amostras positivas. Um dos felinos era fêmea (amostra 40), com 13 anos de idade, da raça Siamês, castrada, pesando 3,7 kg, com acesso à rua, com histórico de quadros de secreção nasal acompanhada de conteúdo purulento, com espirros, dor ao comer e gengivite (figura 4). O animal havia sido submetido a um procedimento de profilaxia dentária, onde foram extraídos dentes da maxila e mandíbula. Foram realizados diversos exames, no qual o histopatológico foi sugestivo de rinite hemorrágica, neutrofílica e linfoplasmocítica, difusa, acentuada. No exame bacteriológico mais antibiograma demonstrou bactérias gram-negativas

como a *Pseudomonas sp.* A felina teve melhora do quadro e a secreção reduziu bastante com o tratamento instituído de acordo com o antibiótico correto, mas, de acordo com os tutores, quase sempre era necessário o uso da nebulização. Pouco tempo depois, ela retornou com piora do quadro dos espirros e secreção respiratória, além da dificuldade em se alimentar, porém, tinha apetite, mas não conseguia mastigar e sentia bastante dor. A felina foi encaminhada para consulta com pneumologista, onde a mesma segue em tratamento. No exame físico, foi constatada gengivite importante, mais intensa ao redor do canino superior direito, além dos dentes inferiores.

Figura 4: felina positiva para FCV, com gengivite.



Fonte: Autora.

Os outros dois felinos positivos para o FCV eram filhotes. Um deles, com quatro meses de idade (amostra 76), tinha secreção ocular e havia sido recolhido na rua, motivo pelo qual não se sabe o histórico do animal. O segundo filhote, com um mês e meio de idade (amostra 75), além de secreção ocular, apresentava descarga nasal (figura 6) e histórico de vômitos e diarreia, ambos de coloração esbranquiçada. Na sequência foi diagnosticado que o felino (amostra 75) (figura 6) tinha co-morbidades, sendo positivo para coronavírus e parvovírus através do teste rápido da Alere®. O animal em questão acabou vindo à óbito antes dos dois meses de vida. Sobre o histórico do animal (amostra 75), foi informado pelo tutor que a mãe do filhote havia

tido recolhida da rua já prenha, e por esse motivo não se sabe mais detalhes do histórico do animal.

Figura 5: filhote com secreção ocular e nasal.



Fonte: Autora.

4.3 IMUNO-HISTOQUÍMICA

Vinte e dois blocos de parafina foram selecionados para verificar se as lesões orais de granuloma eosinofílico dos felinos teriam correlação com o FCV. As amostras de tecidos de felinos com as lesões estavam mantidas no acervo do laboratório de Patologia da UFRGS onde ficam armazenadas. Ao realizar a IHQ, constatou-se que das 22 amostras, 6 continham material insuficiente no bloco de parafina para realizar a técnica. As outras 16 amostras foram negativas para o FCV. A tabela 2 apresenta o histórico clínico e epidemiológico provenientes dos felinos das amostras testadas na IHQ, bem como os resultados.

Tabela 2: Perfil das amostras analisadas por IHQ.

PROTOCOLO	IDADE	SEXO	RAÇA	SINAIS CLINICOS	LOCALIZAÇÃO DAS LESÕES	IHQ CALICIVIRUS
-----------	-------	------	------	-----------------	------------------------	--------------------

AP-2537-06	5 ANOS	F	SRD	DOR NA CAVIDADE ORAL, HALITOSE, SANGRAMENTO	MUCOSA ORAL	MATERIAL INSUFICIENTE
AP-0609-09	2 ANOS	F	SRD	NI	JUNÇÃO MUCO-CUTÂNEA: LÁBIO SUPERIOR	MATERIAL INSUFICIENTE
AP-3064-09	12 ANOS	F	SRD	NI	MUCOSA ORAL: BASE DA LÍNGUA (PORÇÃO VENTRAL DA LÍNGUA	NEGATIVO (MATERIAL INSUFICIENTE)
AP-0833-10	5 ANOS	M	PERSA	NI	MUCOSA ORAL: PORÇÃO VENTRAL DA LÍNGUA	NEGATIVO
AP-2028-11	7	M	SRD	NI	MUCOSA ORAL: PALATO MOLE	NEGATIVO
AP-2881-11	4 ANOS	F	SRD	HALITOSE, DISFAGIA	MUCOSA ORAL: FACE DORSAL DA LÍNGUA	NEGATIVO
AP-3745-11	2 ANOS	M	SRD	NI	MUCOSA ORAL	MATERIAL INSUFICIENTE NO BLOCO DE PARAFINA
AP-1059-12	5 ANOS	F	SRD	NI	PELE: PESCOÇO	NEGATIVO
AP-4365-12	6 ANOS	F	SRD	PRURIDO, HALITOSE	MUCOSA ORAL: LÍNGUA E PALATO MOLE	MATERIAL INSUFICIENTE NO BLOCO DE PARAFINA
AP-3215-13	10 MESES	M	SRD	NI	MUCOSA ORAL: PORÇÃO VENTRAL DA LÍNGUA	NEGATIVO
AP-3452-13	2 ANOS	F	SRD	SANGRAMENTO, DISFAGIA, HALITOSE	JUNÇÃO MUCO-CUTÂNEA: COMISSURA LABIAL	NEGATIVO
AP-1580-14	7 ANOS	M	SRD	NI	MUCOSA ORAL: PORÇÃO VENTRAL DA LÍNGUA	NEGATIVO
AP-2182-15	4 ANOS	F	SRD	SANGRAMENTO, DISFAGIA, HALITOSE	JUNÇÃO MUCO-CUTÂNEA: LÁBIO SUPERIOR	MATERIAL INSUFICIENTE NO BLOCO DE PARAFINA
AP-5055-16	10 ANOS	F	SRD	NI	MUCOSA ORAL	NEGATIVO
AP-5725-16	4 ANOS	F	SRD	NI	LÍNGUA (PORÇÃO VENTRAL DA LÍNGUA)	NEGATIVO
AP-1423-17	2 ANOS	F	PERSA	NI	JUNÇÃO MUCO- CUTÂNEA: LÁBIO INFERIOR	NEGATIVO
AP-1485-17	5 ANOS	M	SRD	NI	JUNÇÃO MUCO-CUTÂNEA: LÁBIO SUPERIOR	NEGATIVO
AP-3782- 3	3	M	SRD	NI	PORÇÃO VENTRAL DA LÍNGUA	NEGATIVO
AP-4708- 4 ANOS	4 ANOS	F	SRD	SIALORREIA	PORÇÃO VENTRAL DA LÍNGUA	NEGATIVO
AP-1242-19 19	9 ANOS	M	SRD	HALITOSE, DISFAGIA	LÍNGUA	NEGATIVO
19	8 ANOS	F	SRD	NI	LÍNGUA	NEGATIVO
19	6 ANOS	M	SRD	NI	GENGIVA	NEGATIVO

5 DISCUSSÃO

O perfil epidemiológico dos felinos infectados pelo FCV é mundialmente descrito (RADFORD et al., 2009); associado principalmente a complicações respiratórias, como é descrito comumente por clínicos e tutores (BINNS, 2000). Muitas vezes acredita-se que a distribuição no Brasil seja semelhante a mundial; no entanto, ainda são poucos os trabalhos envolvendo a presença do vírus no país. Foi realizado o primeiro isolamento por Weiblen e colaboradores (1988) no RS, estudos de patogenia (PEREIRA et al., 1994) e sorologia no RS (FILONI et al., 2006; JOHANN et al., 2009; HENZEL et al., 2013); isolamento e caracterização molecular no Rio Grande do Sul e Rio de Janeiro [RJ] (HENZEL et al., 2012a,b; PEREIRA et al., 2018) e a padronização da técnica de IHQ para diagnóstico *post-mortem* (ROLIM et al., 2016).

No presente trabalho coletas de *swabs* nasais e/ou orais foram realizadas nos municípios da região metropolitana do RS. A primeira etapa compreendeu a identificação molecular do FCV através da RT-PCR, previamente estabelecida (HENZEL et al., 2012b) diretamente das amostras biológicas; e a outra etapa compreendeu a realização de IHQ para detecção do FCV em amostras oro-nasais, caso fosse identificado quadros clínicos sugestivo da infecção por FCV no atendimento clínico, e do acervo do setor de patologia da UFRGS conforme descrito nos objetivos e metodologia.

No entanto, diferente do trabalho realizado na região central do RS por HENZEL, e colaboradores (2012b) entre 2006 – 2010, no qual compreendeu a coleta de *swabs* orais, nasais e oculares oriundos de gatos doentes e saudáveis, com perfis epidemiológicos distintos quanto faixa etária, sexo, tipo de convívio (gatis, isolados e com acesso à rua); foi realizado isolamento prévio em cultivo celular; sendo o objetivo principal, isolar e caracterizar o FCV e o FeHV-1. Neste trabalho, a técnica de PCR foi utilizada como ferramenta confirmatória na detecção dos vírus, bem como, para detectar possíveis co-infecções. Além disso, caracterizar geneticamente o gene da proteína no capsídeo do FCV foi um dos propósitos, bem como ampliar e atualizar o acervo genético do FCV em bancos de dados contribuindo para os estudos de distribuição filogenética em nível nacional e mundial.

No trabalho foram analisados animais que possuem tutores, com ou sem acesso à rua, já no estudo realizado no estado do RJ, Pereira et al., (2018), foram analisados dois modelos distintos de criação e/ou convívio dos felinos, totalizando 26 amostras conjuntivais coletadas entre os anos 2013 e 2015. Os gatos coletados viviam em cinco abrigos de animais públicos de curta duração e três casas de longa vida *multicat* (o qual compreende um curto período de

tempo de alojamento até a doação). Neste trabalho também foi realizado isolamento em cultivo celular e o gene alvo na detecção e análise genética foi também a ORF2, porém, quase na sua totalidade, desde a região A a F (todas as regiões conservadas e as variáveis/hipervariáveis), diferente do que tem sido analisado por Henzel et al., (2012a) e foi realizado no presente trabalho, com ênfase as regiões C a E.

A análise das regiões variáveis da ORF2 (C a E), para nosso conhecimento, possibilita também uma análise e compreensão do escape viral pelo sistema imune bem como para a compreensão das falhas vacinais. Além disso, o estudo detalhado da ORF2 associado ao quadro clínico tem sido a ferramenta de diagnóstico padrão para a síndrome hemorrágica virulenta sistêmica denominada (VSD- FCV) já descrita em outros países desde 2000 após o primeiro relato (ABD-ELDAIM et al., 2005). Já no Brasil, não foi ainda descrita na literatura nenhum caso relacionado a essa síndrome, porém, há uma grande probabilidade de que as cepas altamente virulentas associadas ao FCV estejam circulando e a qualquer momento possa ser diagnosticada, o qual tornou-se intrinsecamente um dos propósitos do trabalho.

No trabalho de Henzel et al., (2012a) e Pereira et al., (2018) foi realizado isolamento prévio em cultivo celular, o que difere do presente trabalho, onde a detecção ocorreu diretamente da amostra biológica, com o objetivo de viabilizar a sua aplicação na rotina diagnóstica das clínicas. Porém, sabe-se que o isolamento prévio em cultivo celular possibilita e/ou potencializa a detecção de um número maior de amostras positivas, mesmo sabendo da sensibilidade da RT-PCR, sabe-se que o isolamento prévio permite uma amplificação viral efetiva, aumentando assim a carga viral na detecção molecular. Além disso, um dos fatores que provavelmente limitaram a detecção de mais amostras positivas no presente trabalho foi a presença de inibidores da reação da PCR como: bactérias dos tratos coletados bem como ambientais durante o procedimento de coleta, temperatura de armazenamento após a coleta, assim como o envolvimento de outros vírus com sinais clínicos semelhantes ao FCV, como FeHV-1. Um dos objetivos de realizar a detecção genômica diretamente dos swabs, é viabilizar a sua aplicação na rotina diagnóstica das clínicas.

Os dados apresentados e obtidos neste presente trabalho, trazem informações sobre a epidemiologia do FCV na população de felinos de diferentes idades, os quais residem na região metropolitana do estado do RS, depois de quase uma década do último estudo dessa natureza. Porém, já tem sido constatado que a maioria dos felinos positivos para FCV foram observados em animais sem manifestação clínica e/ou subclínica (HENZEL et al., 2012a). Pereira (2017) relatou no seu trabalho que o FCV não foi associado a quadros de conjuntivite ou sinais em cavidade oral, mas foi encontrado na conjuntiva e cavidade oral tanto de gatos sintomáticos

quanto assintomáticos. Tal fato foi associado ao hábito de lambedura (*grooming*) em felinos, o que explica a ampla disseminação do vírus na população. A estimulação de um certo nível de imunidade pode explicar a ausência de sinais respiratórios em gatos adultos (STILES, 2003; GASKELL et al., 2007; THIRY et al., 2009). Foi evidenciado de modo preocupante que o mesmo ocorreu entre os animais vacinados, e isso pode ser uma fonte de infecção, especialmente para filhotes. No entanto, a natureza e o protocolo vacinal não foram avaliados, devido ao não acesso a essa informação, porém, no presente trabalho, foi avaliado o protocolo vacinal para saber a relação que pode vir a ter com o FCV. Além disso já pode-se observar um *status* vacinal diferente do que tem sido descrito na região central e sul do RS por Johann e colaboradores (2009), 16,4%, e por Henzel et al., (2013 e 2012b) de 6 e 29% respectivamente. Notou-se que esse percentual se elevou neste trabalho, constatando que 45,7% da população de felinos estudada tinha um protocolo vacinal, corroborando do que pode se observar nas clínicas veterinárias (observações das autoras). Isso muitas vezes é consequência de uma maior conscientização da população, associada ao acesso de produtos veterinários, ao número de clínicas veterinárias concentradas na região metropolitana, bem como a maior densidade de centros universitários no âmbito médico veterinário. De outro lado, a seguridade do protocolo vacinal bem como o tipo de vacina administrada não foi avaliada nos estudos anteriores (JOHANN et al., 2009; HENZEL et al., 2013); já no presente trabalho, no momento da coleta uma resenha detalhada sobre a vacina e vacinação (viva ou atenuada, marca e calendário vacinal) foi investigada, objetivando detectar uma possível correlação molecular e filogenética com as cepas vacinais circulantes e os isolados.

Sabe-se que a forma mais eficaz para prevenir o FCV é a vacinação, mesmo não prevenindo a infecção e o estado de portador. Neste trabalho constatou-se que os tutores estão mais preocupados com a saúde dos seus animais, pois os felinos alvo do estudo estavam em sua maioria vacinados. Salienta-se que a eficácia da vacina na proteção contra a doença tem sido questionada pelos clínicos, o que torna o conhecimento molecular dos isolados circulantes na população de felinos domésticos uma fonte importante aos profissionais da área veterinária, principalmente as empresas que formulam vacinas. A necessidade da reformulação das atuais vacinas quanto às cepas utilizadas foi o objetivo inicial do presente trabalho.

Diferentemente do trabalho de Henzel e colaboradores (2012), no qual a maior porcentagem de felinos positivos para FCV eram clinicamente saudáveis, no presente trabalho os felinos positivos para FCV demonstraram sinais clínicos, como: lacrimejamento, corrimento nasal, secreção ocular e lesões orais. Além dos sintomas clínicos apresentados, esses felinos

não eram vacinados, conviveram em um momento da vida com outros gatos, e tiveram acesso à rua.

Pereira (2018), relata no seu trabalho que obteve duas amostras positivas para o FCV de um gato de quatro meses e de outro de oito meses, e ambos apresentaram no momento da coleta hiperemia conjuntival leve. O segundo animal também apresentou sinal respiratório. Tais dados também foram analisados no presente trabalho, apresentando também duas amostras positivas para o FCV em dois felinos, ambos filhotes (um mês e meio e quatro meses de idade), apresentando sinais clínicos do calicivírus.

A idade dos felinos que frequentam as clínicas veterinárias também chama atenção. Felinos de um a cinco anos predominam nessa população, mostrando que os há uma grande concentração de gatos adultos jovens na região metropolitana do RS. Quanto ao sexo dos animais, não houve diferença digna de nota, diferente da raça, onde se nota que mais que 90% são animais sem raça definida.

Um estudo retrospectivo realizado por Carvalho (2020), demonstrou que a maioria dos gatos infectados pelo FCV eram do gênero feminino (61,5%), não castrados (57,7%) e de raça determinada (92,3%). A idade média foi de 3 a 4,6 anos. Os gatos jovens, de idade inferior ou igual a 2 anos, apresentaram a maior frequência de infecção (53,9%). Detectaram-se elevadas proporções de calicivirose felina em gatos com estilo de vida livre ou semi-livre (69,2%), em gatos originários da rua (50,0%) e em gatos não vacinados ou com o plano vacinal atrasado (65,4%). A maioria dos felídeos (88,5%) coabitavam com pelo menos outro animal de companhia e 53,9% tinha uma doença concomitante. A duração média de internamento foi de $3,8 \pm 2,9$ dias. Os corrimentos nasais e os corrimentos oculares purulentos (65,4%), as úlceras orais (57,7%), a gengivo-estomatite (53,8%), a halitose (34,6%) e os espirros (30,4%) foram os sinais clínicos específicos mais frequentes. Vinte e dois gatos (88%) tiveram alta clínica, apenas 12,0% faleceram devido à calicivirose felina, mas 87,5% foram considerados portadores crônicos nas consultas de seguimento. Todos os gatos investigados residiam no distrito de Lisboa. Julho foi o mês com maior frequência de casos de FCV (38,5%) e o verão a estação do ano com maior frequência de gatos internados com FCV (46,2%). Em comparação aos dados analisados do trabalho, salienta-se que os animais em sua grande maioria coletados também são adultos na faixa etária de 1 a 5 anos, porém, em quase sua totalidade eram felinos sem raça definida.

Através dos resultados da IHQ não se observou correlação de lesões de granuloma eosinofílico em felinos com o FCV, auxiliando no descarte do FCV nas hipóteses para essas manifestações clínicas e/ou de patologia clínica. Segundo Rey (2004), as especulações

etiológicas sobre o granuloma eosinofílico são numerosas, sendo citadas as causas virais, genéticas, bacterianas, auto-ímmunes, parasitárias e alérgicas. Entre as mais importantes estão as alergias, que incluem aquelas de origem alimentar, as decorrentes de picada de pulga, a atopia e a hipersensibilidade à picada de mosquito. Devido à sensibilidade da técnica imunohistoquímica, tem-se admitido que o processamento de peças histológicas com tempos excessivos de fixação e descalcificação pode danificar os sítios de ligação dos anticorpos nos tecidos e interferir na marcação com o aparecimento de falso-negativo (PERTOT et al., 1997).

No trabalho detectamos 3 amostras positivas para o FCV, mas, apesar de ainda não possuímos o sequenciamento genético das amostras positivas para FCV, os achados auxiliam e potencializam que uma avaliação contínua e detalhada das amostras de FCV circulantes na população é de suma importância para esclarecer a evolução destes vírus, bem como proporcionar uma melhor compreensão dos mecanismos que impulsionam a evolução do FCV no RS e sua importância clínica-epidemiológica. Associado a isso, a divulgação dos resultados gerados pelos trabalhos estima-se que os clínicos possam ter maior embasamento científico e informação frente a estratégias de controle e prevenção.

6 CONCLUSÃO

Os animais positivos representando 4,3% das amostras tinham sinais clínicos do FCV, acesso à rua, e não possuíam vacinas. O RT-PCR se mostrou útil para o rastreamento do FCV. A IHQ demonstrou que o granuloma eosinofílico não tem correlação com o FCV.

Enfatizamos a importância das doenças do trato respiratório superior de felinos, e, especificamente, da calicivirose, no exercício da prática clínica, na saúde e no bem-estar, e na importância de informar os tutores da necessidade do cumprimento dos protocolos vacinais. As informações trazidas neste trabalho podem também contribuir para novos estudos direcionados a uma melhor caracterização do FCV, e, principalmente, alertar os clínicos sobre as medidas necessárias para a identificação, controle e prevenção da calicivirose felina.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABD-ELDAIM M.; POTGIETER L.; KENNEDY M. Genetic analysis of feline caliciviruses associated with a hemorrhagic-like disease. *J Vet Diagn Invest.* 17. 420–429, 2005.

ABINPET. **Associação Brasileira de Indústria de Produtos para Animais.** Mercado Pet Brasil. São Paulo. Disponível em: <<http://abinpet.org.br/site/mercado>>. Dados 2019. Acesso em: 20 set. 2020.

BANNASCH, M. J.; FOLEY, J. E. Epidemiologic evaluation of multiple respiratory pathogens in cats in animal shelters. *J. of Fel. Med. and Surg.* 7(2): 109-119, 2005.

BAULCH-BROWN, C.; LOVE, D.; MEANGER, J. Sequence variation within the capsid protein of Australian isolates of feline calicivirus. *Vet. Mic.* 68, 1-2, 107-117, 1999.

BELLEI, E.; DALLA, F.; MASETTI, L.; PISONI, L.; JOECHLER, M. Surgical therapy in chronic feline gingivostomatitis (FCGS). *Vet. Res. Com.* 32(1): 231-234, 2008.

BENNETT, D.; GASKELL, R. M.; MILLS, A.; KNOWLES, I.; CARTER, S.; MCARDLE, F. Detection of feline calicivirus antigens in the joints of infected cats. *Vet. Rec.* 124, 329–332, 1989.

BINNS, S.H.; DAWSON, S.; SPEAKMAN,*- A. J.; CUEVAS, L. E.; HART, C. A.; GASKELL, C. J.; MORGAN, K. L.; GASKELL, R. M. A study of feline upper respiratory tract disease with reference to prevalence and risk factors for infection with feline calicivirus and feline herpesvirus. *J. Feline Med. Surg.* 2, 123-133, 2000.

CAI, Y.; FUKUSHI, H.; KOYASU, S.; KURODA, E.; YAMAGUCHI, T.; HIRAI, K. An etiological investigation of domestic cats with conjunctivitis and upper respiratory tract disease in Japan. *The J. of Vet. Med. Scien.* 64(3): 215-219, 2002.

CARVALHO, A. J. S. Calicivirose felina - um estudo retrospectivo [dissertação de mestrado]. Lisboa: FMV-Universidade de Lisboa, 2020.

CLAY, S.; MAHERCHANDANI, S.; MALIK, Y. S.; GOYAL, S. M. Survival on uncommon fomites of feline calicivirus, a surrogate of noroviruses. *Am. J. Infect. Control*, Saint Louis, 34, 41-43, 2006.

COMAC. Comissão dos Animais de Companhia. **Pesquisa Radar Pet 2020**. Disponível em: <<http://www.sindan.org.br/wp-content/uploads/2021/02/RADAR-PET-2020.pdf>> Dados: 2020. Acesso em 28. Mar. 2021.

COYNE, K. DAWSON, S.; RADFORD, A. D.; CRIPPS, P. J.; PORTER, C. J.; MCCRACKEN, C. M.; GASKELL, R. M. Long-term analysis of feline calicivirus prevalence and viral shedding patterns in naturally infected colonies of domestic cats, *Vet. Microb.* v. 118, n. 1-2, p. 12–25, 2006a.

DESCHAMPS, J. Y.; TOPIE, E.; ROUX, F. Nosocomial feline calicivirus-associated virulent systemic disease in a veterinary emergency and critical care unit in France. *J. Fel. Med. and Surg.* v. 1, n. 2, p. 1-9, 2015.

DOLIESLAGER, S. M. J.; BENNET, D.; JOHNSTON, N.; RIGGIO, M. P. Novel bacterial phylotypes associated with the healthy feline oral cavity and feline chronic gingivostomatitis. *Res. Vet. Sci.* 94, 428–432, 2013.

FARCAS, N.; LOMMER, M. J.; KASS, P. H.; VERSTRAETE, F. J. Dental radiographic findings in cats with chronic gingivostomatitis (2002–2012). *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 244, 339-345, 2014.

FILONI, C.; CATAO-DIAS, J. L.; BAY, G.; DURIGON, E. L.; JORGE, R. S.; LUTZ, H.; HOFMANN-LEHMANN, R. Primeira evidência de exposição a herpesvírus felino, calicivírus, parvovírus e Ehrlichia em felinos de vida livre no Brasil. *J. Wildl. Dis.* 42 (2), 470-477, 2006.

GASKELL, R.; KNOWLES, J. Feline respiratory disease. Update. In ____ *Practice*. 11, 23-26, 1989.

GASKELL, R. M.; DAWSON, S.; RADFORD, A.; THIRY, E. Feline herpesvirus. *Vet. Res.* 38(2): 337-354, 2007.

GASKELL, R. M.; DAWSON, S.; RADFORD, A. Feline Respiratory Disease. In Greene CE, editor. *Infect. Dis. of the Dog and Cat*. 4th ed. St. Louis (MO): Elsevier Saunders; p. 151-162, 2012.

GEISSLER, K.; SCHNEIDER, K.; TRUYEN, U. Mapping neutralizing and non-neutralizing epitopes on the capsid protein of feline calicivirus. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health.* 49, 55-60, 2002.

GLENN, M.; RADFORD, A. D.; TURNER, P. C.; CARTER, M.; LOWERY, D.; DESILVER, D. A.; MEANGER, I.; BAULCH-BROWN, C.; BENNETT, M.; GASKELL, R. M. Nucleotide sequence of UK and Australian isolates of feline calicivirus (FCV) and phylogenetic analysis of FCVs. *Vet. Microbiol.* 67, 175-193, 1999.

GRACE, S. F. Herpesvirus infection. In G. D. Norsworthy MA, Crystal SF, Grace LP, Tilley Eds. *The Fel. Pat.* 4th ed. Iowa, USA: Blackwell Science Ltda; p. 225-227, 2011.

GREEN, K. Y.; ANDO, T.; BALAYAN, M. S.; BERKE, T.; CLARKE, E. M.; ESTES, M. K.; MATSON, D. O.; NAKATA, S.; NEILL, J. D.; STUDDERT, M. J.; THIEL, H. J. Taxonomy of the caliciviruses. *J. Infect. Dis.*, 181, 322-S330, 2000.

HARBOUR, D. A.; HOWARD, P. E.; GASKELL, R. M. Isolation of feline calicivirus and feline herpesvirus from domestic cats 1980 to 1989. *Vet. Rec.* 128 77-80, 1991.

HELPS, C. R.; LAIT, P.; DAMHUIS, A.; BJORNEHAMMAR, U.; BOLTA, D.; BROVIDA, C.; CHABANNE, L.; EGBERINK, H.; FERRAND, G.; FONTBONNE, A.; PENNISI, M. G.; GRUFFYD-JONES, T.; GUNN-MOORE, D.; HARTMANN, K.; LUTZ, H.; MALANDAIN, E.; MOSTL, K.; STENGEL, C.; HARBOUR, D. A.; GRAAT, E. A. Factors associated with upper respiratory tract disease caused by feline herpesvirus, feline calicivirus, *Chlamydomyces felis* and *Bordetella bronchiseptica* in cats: experience from 218 European catteries. *Vet. Rec.* 156(2): 669-673, 2005.

HENNET, P. R. Chronic gengivo-stomatitis in cats: long-term follow-up of cases treated by dental extraction. *J. Vet. Dent.* 14, 15–21, 1997.

HENNET, P. Relationship between oral calicivirus and herpesvirus carriage and “palatoglossitis” lesions. In: Annual veterinary dental forum & world veterinary dental congress IX, Orlando. Proceeding. Academy of Veterinary Dentistry, *Amer. Vet. Dental Col., Ame. Vet. Dental Soc.* 503, 2005.

HENNET P. R.; CAMY, G. A. L.; MCGAHIE, D. M.; ALBOUY, M. V. Comparative efficacy of a recombinant feline interferon omega in refractory cases of calicivirus-positive cats with caudal stomatitis: a randomised, multi-center, controlled, double blind study in 39 cats. *J. Feline Med. Surg.* 13, 577–87, 2011.

HENZEL, A.; SILVA, M. S.; LUO, S.; LOVATO, L. T.; WEIBLEN, R. Genetic and phylogenetic analyses of capsid protein gene in feline calicivirus isolates from Rio Grande do Sul in southern Brazil. *Vir. Res.* 163, 2, 667-671, 2012a.

HENZEL, A.; BRUM, M. C. S.; LAUTERT, C.; MARTINS, M.; LOVATO, L. T.; WEIBLEN, R. Isolation and identification of feline calicivirus and feline herpesvirus in Southern Brazil. *Braz J Microbiol.*, 43 (2): 560-8, 2012b.

HENZEL, A.; BRUM, M. C. S.; LOVATO, L. T.; WEIBLEN, R. Serological Survey of Feline Calicivirus and Felid herpesvirus in Rio Grande do Sul. *Acta Scien. Vet.* 41, 1-6, 2013.

JOHANN, J. M.; CAETANO, C. F.; HASS, R.; GUIM, T. N.; FISCHER, G.; VARGAS, G. D.; VIDOR, T.; HUBNER, S. O. Serum survey for antibodies to coronavirus, herpesvirus, calicivirus, and parvovirus in domestics cats from Rio Grande do Sul, Brazil. *Arq. Bras. Medic. Vet. Zootec*, 61, p. 752-754, 2009.

INSTITUTO PET BRASIL. Censo Pet. Disponível em : <http://institutopetbrasil.com/imprensa/censo-pet-1393-milhoes-de-animais-de-estimacao-no-brasil/> Dados 2019. Acesso em: 28. Mar. 2021.

- KIMURA, M. A simple method to estimate evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Molec. Evol.* 16, 111-120, 1980.
- KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. Mega 7: Molecular Evolutionary Genetic Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33, 7, 1870-1874, 2016.
- KREUTZ, L. C.; JOHNSON, R. P.; SEAL, B. S. Phenotypic and genotypic variation of feline calicivirus during persistent infection of cats. *Vet. Microbiol.* 59, 229-236, 1998.
- LAURITZEN, A.; JARRETT, O.; SABARA, M. Serological analysis of feline calicivirus isolates from the United States and United Kingdom, *Vet. Microbiol.* 56, 55-63, 1997.
- LEIRIÃO-RIVA, F. P.; KOWALESKY, J.; LEON-ROMAN, M. A.; GIOSO, M. A.; OMURA, C. M. Estomatite Linfocítica Plasmocitária em Felinos. In: Congresso Paulista de Medicina Veterinária. **Resum. de Trab.** 37-8, 2004.
- LOMMER, M. J.; VERSTRAETE, F. J. M. Concurrent oral shedding of feline calicivirus and feline herpesvirus 1 in cats with chronic gingivostomatitis. *Oral Microbiol. Immunol.* 8, 131-134, 2003.
- MATILDE K. S.; LOURENÇO, M. L. G.; ZAHN, F. S.; MACHADO, L. H. A. Complexo gengivite estomatite felina: Revisão de Literatura. *Med. Vet. Zoot.* 20, 2, 60- 170, 2013.
- MURPHY, F. A.; GIBBS, E. P. J.; HORZINEK, M. C.; STUDDERT, M. J. Herpesviridae. *Veterinary Virology* 3rd ed. San Diego, USA: **Academic Press**, Elsevier; p. 301-326, 1999.
- NEIL, J. D. Nucleotide sequence of the capsid protein gene of two serotypes of San Miguel sea line virus: identification of conserved and non-conserved amino acid sequences among calicivirus sequences. *Virus Res.* 24, 211-222, 1992.
- OHE, K.; SAKAI, S.; TAKAHASI, T.; SUNAGA, F.; MURAKAMI, M.; KIUCHI, A.; FUKUYAMA, M.; HARA, M.; ISHIKAWA, Y.; TANENO, A. Genogrouping of vaccine breakdown strains (VBS) of feline calicivirus in Japan. *Vet. Res. Communic.* 31, 4, 497-507, 2007.

PEDERSEN, N. C.; ELLIOT, J. B.; GLASGOW, A.; POLAND, A.; KEEL, K. An isolated epizootic of hemorrhagic-like fever in cats caused by a novel and highly virulent strain of feline calicivirus. *Vet. Microbiol.* 73, 281-300, 2000.

PEREIRA, N. M.; WEIBLEN, R.; PALMEIRA, A. B.; CANABARRO, T. F.; Calicivirus: inoculação experimental e isolamento. *Rev. Patol. Trop.* 23 (2), 159-168, 1994.

PEREIRA, J. J.; BAUMWORCEL N.; FIORETTI J. M.; DOMINGUES C. F.; MORAES L. F.; MARINHO R. S. S.; VIEIRA M. C. R.; PINTO A. M. V.; CASTRO T. X.; Caracterização molecular de variantes felinas de calicivírus de residências multicat e abrigos públicos de animais no Rio de Janeiro, Brasil. *Braz. J. Microbiol.* 49. 4, 2018.

PERTOT, W.J.; SINDRES, V.; SZEKERES, G.; PROUST, J. P. Model for quantitative immunohistochemical assessment of pulpal response to biomaterials. *J Biom. Mat. Res.* 1997; 34(4): 457-62.

POULET, H.; BRUNET, S.; SOULIER, M.; LEROY, V.; GOUTEBROZE, S.; CHAPPUIS, G. Comparison between acute oral/respiratory and chronic stomatitis/gingivitis isolates of feline calicivirus: pathogenicity, antigenic profile and cross-neutralisation studies. *Arch. Virol.* 145, 243-261, 2000.

POVEY, R. C.; JOHNSON, R. H. Observations on the epidemiology and control of viral respiratory disease in cats. *J. Small Anim. Practice.* 11, 7, 485-494, 1970.

QUIMBY J. M.; ELSTON, T.; HAWLEY, J.; BREWER, M.; MILLER, A.; LAPPIN, M. R. Evaluation of the association of Bartonella species, feline herpesvirus 1, feline calicivirus, feline leukemia virus and feline immunodeficiency virus with chronic feline gingivostomatitis. *J Feline Med Surg.* 10, 66–72, 2008.

RADFORD, A. D.; COYNE, K. P.; DAWSON, S.; et al. Feline Calicivirus. *Vet. Res.* v. 38, n. 2, p. 319-355, 2007.

RADFORD, A. D.; ADDIE, D.; BELÁK, S.; BARALON, C. B.; EGBERINK, H.; FRYMUS, T.; JONES, T. G.; HARTMANN, K.; HOSIE, M. J.; LLORET, A.; LUTZ, H.; MARSILIO, F.; PENNISI, M. G.; THIRY, E.; TRUYEN, U.; HORZINEK, M. C. Feline Calicivirus Infection. ABCD guidelines on prevention and management. *J. Feline Med. Surg.* 11, 7, 556-564, 2009.

REY, M. D.; Eosinophilic granuloma complex. [online].[cited 2004] Disponível em: <<http://www.skinvet.com/diseasedetail.asp?index=10>>. Acesso em 03 out. 2020.

ROLIM, V. M.; PAVARINI, S. P.; CAMPOS, F. S.; PIGNONE, V.; FARACO, C.; MUCCILLO, M. S.; ROEHE, P. M.; COSTA, F. V. A.; DRIEMEIER, D. Clinical, pathological, immunohistochemical and molecular characterization of feline chronic gingivostomatitis. *J. Feline Medic. Surgery.* 19, 403-409, 2016.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406-425, 1987.

SCHORR-EVANS, E. M.; POLÔNIA, A.; JOHNSON, W. E.; PEDERSEN, N. C. An epizootic of highly virulent feline calicivirus disease in a hospital setting in New England. *J. Feline Med. Surgery.* 5, 217-226, 2003.

SEAL, B. S.; RIDPATH, J. F.; MENGELING, W. L. Analysis of feline calicivirus capsid protein genes: identification of variable antigenic determinant regions of the protein. *J. General Virol.* 74, 11, 2519-2524, 1993.

SILVA, A. L. S.; PADILHA, M. L.; SILVA, A. C.; SOUZA, A. R.; RODRIGUES, V. J.; FERNANDES, T. S.; HIGINO, S. S. S. Complexo Respiratório Felino – Levantamento de Casos. *Rev. Agro. Sem.* 4, 4, 51-54, 2020.

SOSNOVTSEV, S.V.; GREEN, K.Y. Identification and genomic mapping of the ORF3 and VPg proteins in feline calicivirus virions. *Virol.* 277, 193-203, 2000.

SOUTHERDEN, P.; GORREL, C. Treatment of a case of refractory feline chronic gingivostomatitis with feline recombinant interferon Omega. *Jour. of Small Anim. Prac.* 48, 104-106, 2007.

SOUZA, H. J. M.; CALIXTO, R. Complexo Respiratório Viral Felino. In: SOUZA, H. J. M. *Colet. Med. Cirur. Fel.* 51-66, 2003.

STILES, J. Feline herpesvirus. *Clin. Tech. in Small Anim. Prac.* 18(3): 178-185, 2003.

SYKES, J. E. WESTTROP J. L.; KASTEN R. W.; CHOMEL, B. B. Association between Bartonella species infection and disease in pet cats as determined using serology and culture. *J Fel. Med. Surg.* 12: 631–636, 2010.

SYKES, J. E. Feline respiratory viral infections. In: Sykes J. E., editor. *Can. fel. infec. Dis.* St. Louis (MO): Elsevier Saunders. p. 239-251, 2014.

THIRY, E.; ADDIE, D.; BELÁK, S.; BARALON, C. B.; EGBERINK, H.; FRYMUS, T.; JONES, T. G.; HARTMANN, K.; HOSIE, M. J.; LLORET, A.; LUTZ, H.; MARSILIO, F.; PENNISI, M. G.; RADFORD, A. D.; TRUYEN, U.; HORZINEK, M. C. Feline herpesvirus infection ABCD guidelines on prevention and management. *J. Fel. Medic. Surg.*, 11, 547-555, 2009.

TOHYA, Y.; YOKOYAMA, N.; MAEDA, K.; KAWAGUCHI, Y.; MIKAMI, T. Mapping of antigenic sites involved in neutralization on the capsid protein of feline calicivirus. *J. Gen. Virol.* 78, 303-305, 1997.

WEIBLEN, R.; RAISER, A. G.; RAHAL, S.C.; CANABARRO, T. F. Isolation of feline calicivirus from cats in Brazil. *Vet. Rec.* 122, 94-95, 1988.

WIGGS, R. B.; LOBPRISE, H. B. Veterinary dentistry - Principles e pratice. *Philad.: Lip.-Raven*, 1997.

WINER, J. N.; ARZI B.; VERSTRAETE, F. J. M. Therapeutic management of feline chronic gingivostomatitis: a systematic review of the literature. *Front Vet Sci.* 3, 54, 2016.

ANEXOS



PARECER N.º 11/2019 – CEUA FEEVALE

Avaliação da Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA FEEVALE – do projeto número 03.19.078.

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Feevale analisou o projeto "Caracterização clínico-epidemiológica, patológica e molecular do Calicivírus felino provenientes de amostras oronasais coletadas em uma clínica veterinária, Porto Alegre, Rio Grande do Sul" submetido pela pesquisadora responsável Daniela Saul Friedrich como proposta de como proposta de dissertação do Mestrado Acadêmico em Virologia.

Em conformidade com a Lei nº 11.794 de 08 de outubro de 2008 e com as normas internas da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Feevale, todos os documentos necessários à análise por esta Comissão, do projeto acima referido, foram apresentados.

Este projeto preserva os aspectos éticos relacionados aos animais da pesquisa, sendo, portanto, aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Feevale, em 17 de dezembro de 2019, bem como aprovada a utilização de 200-300 animais da espécie gatos.

Reiteramos que a Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituição encontra-se à sua disposição para equacionar eventuais dúvidas e/ou esclarecimentos que se fizerem necessários.

Parecer final: APROVADO

Novo Hamburgo, 17 de dezembro de 2019.

Prof. Dr. Gunther Gehlen
Vice-Coordenador da Comissão de
Ética no Uso de Animais da
Universidade Feevale.



CERTIFICADO DE PROJETO DE PESQUISA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA

Certificamos que o projeto intitulado "Caracterização clínico-epidemiológica, patológica e molecular do Calicivírus felino provenientes de amostras oronasais coletadas em uma clínica veterinária, Porto Alegre, Rio Grande do Sul", protocolo nº 03.19.078, sob a responsabilidade de Daniela Saul Friedrich – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-FEEVALE) DA UNIVERSIDADE FEEVALE, em reunião de 10/01/2020.

Vigência do Projeto	15/05/2019 a 14/05/2021
Espécie/ linhagem	Gatos
Nº de animais	200-300
Peso/ Idade	-
Sexo	-
Origem	

Novo Hamburgo, 10 de janeiro de 2020.

Prof. Dr. Gunther Gehlen
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Feevale

ANEXO A**TERMO DE COPARTICIPAÇÃO EM PROJETO**

Eu, **Alexandre Garcia Dassow**, CRMV/RS 10520, atesto que conheço o projeto intitulado “Caracterização clínico-epidemiológica, patológica e molecular do calicivírus felino provenientes de amostras oronasais coletadas em uma clínica veterinária, Porto Alegre, Rio Grande do Sul”, e que aceito ser copartícipe da pesquisa, indicando os pacientes que estiverem sob minha responsabilidade técnica para inclusão nos grupos de estudo, desde que estejam devidamente autorizados pelos tutores (conforme Anexo B).

Novo Hamburgo, 15 de agosto de 2020.

Alexandre Garcia Dassow

Médico Veterinário

CRMV/RS 10520

CPF: 82495009034

ANEXO B

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado (a) a participar, como voluntário, em uma pesquisa. Após ser esclarecido (a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Na sua cópia consta o telefone e endereço institucional do pesquisador principal, de modo que você poderá tirar suas dúvidas sobre o projeto e a participação do seu gato, agora ou a qualquer momento. Em caso de recusa ou desistência você não será penalizado(a) de forma alguma. Em caso de dúvida você pode procurar o Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA) da Universidade Feevale – ceua@feevale.br

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA

Título do projeto: Caracterização do calicivírus felino circulante na região metropolitana do Rio Grande do Sul.

Pesquisador responsável: Prof. Dra. Andréia Henzel.

Endereço: ERS-239, nº 2755, campus II da Universidade Feevale, prédio branco, sala 003. Novo Hamburgo, Bairro Vila Nova, RS - CEP 93525-075.

Aluna responsável: Daniela Saul Friedrich, Feevale, Campus II, Mestrado Acadêmico em Virologia.

Telefone para contato: (51) 981052549

E-mail: sf_dani@hotmail.com

Seu felino está sendo convidado para participar da pesquisa “Caracterização do calicivírus felino circulante na região metropolitana do Rio Grande do Sul”. Seu felino foi selecionado e a participação do mesmo não é obrigatória. A qualquer momento você pode desistir e retirar seu consentimento para o seu felino fazer parte da pesquisa. Sua recusa não trará nenhum prejuízo na relação do seu animal com o pesquisador ou com a instituição. O objetivo deste projeto é determinar o perfil clínico-epidemiológico da população felina acometida pelo calicivírus felinos (FCV). E, para atender o propósito central do projeto, serão realizadas coletas (*flush* e/ou biópsia, biópsia inferior a 0,5 centímetros) que serão submetidas à análise

virológica: por detecção molecular, o *flush* e biópsia; e por IHQ (imuno-histoquímica) as biópsias. Devido ao grau de invasividade ser nível 2 (G.I.2 = experimentos que causam estresse, desconforto ou dor, de leve intensidade), serão implicados alguns riscos do tipo: incomodo, “stress”, de introdução da agulha para anestesia, incomodo devido a contenção do médico veterinário clínico e o auxiliar, e desconforto do pós-operatório que podem vir acompanhada de alteração no apetite. No entanto, o benefício dos felinos participarem do estudo, é para que possamos ter um melhor conhecimento clínico-epidemiológico da população felina acometida pelo FCV, e, assim, poderá auxiliar nos futuros diagnósticos, bem como tornar o tratamento mais efetivo e assertivo. A pesquisa será realizada na Universidade Feevale – Campus II – Novo Hamburgo/RS.

Serão realizados exames complementares hemograma, perfil bioquímico, testes de coagulação como tempo de protrombina (TP), tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa); e estando o paciente em estado geral bom e apto a passar por um procedimento anestésico, será realizada radiografia de cavidade nasal e seios frontais e coleta de material nasal através de punção com agulha fina, flush (lavado) nasal, e pequenos fragmentos de áreas com lesão, com o auxílio de um videorinoscópio. O material colhido será submetido à análise virológica. Pacientes com de sete anos ou mais, ou com histórico ou exame clínico de cardiopatia, deverão passar por ecocardiograma prévio ao procedimento anestésico.

Você terá a garantia de sigilo das informações obtidas bem como o direito de retirar o consentimento a qualquer tempo.

CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, _____, RG _____, CPF _____, abaixo assinado, proprietário do felino da raça _____, sexo _____, idade _____, denominado de _____, ficha HCV _____, concordo em ceder meu animal para participar do projeto “Caracterização do calicivírus felino circulante na região metropolitana do Rio Grande do Sul”, bem como o registro fotográfico do mesmo.

Declaro que entendi os objetivos, riscos e benefícios da participação do meu felino e que fui devidamente informado(a) e esclarecido(a) pela mestrandia pesquisadora Daniela Saul Friedrich e sua orientadora Andréia Henzel, sobre a pesquisa e os procedimentos nela envolvidos. Foi-me garantido que posso retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade ou interrupção do acompanhamento do meu animal.

Novo Hamburgo, ____ de _____ de 20__.

Assinatura do proprietário

Assinatura do aluno (mestrando)

Assinatura do orientador (pesquisador responsável)