

DETECÇÃO DO VÍRUS DA PERITONITE INFECCIOSA FELINA (FIPV) POR MEIO DA PCR.

(DETECTION OF FELINE INFECTIOUS PERITONITIS VIRUS (FIPV) USING PCR).

(DETECCIÓN DEL VÍRUS DE LA PERITONITIS INFECCIOSA FELINA (FIPV) POR MEDIO DE PCR).

G. S. MONTELEONE^{1*}, P. E. BRANDÃO², C. DEMÉTRIO³, F. GREGORI⁴, C. ROSA⁵,
C. A. R. ROSALES⁶, P. SOARES³, R. M. SOARES⁷, L. Y. B. VILLARREAL⁸,
L. J. RICHTZENHAIN⁹, J. A. JEREZ⁷

RESUMO

A peritonite infecciosa dos felinos (PIF) é uma doença geralmente fatal de felinos selvagens e domésticos. O agente etiológico da PIF (Feline Infectious Peritonitis Virus, FIPV) é um coronavírus; um RNA vírus envelopado de fita simples da família *Coronaviridae*. O presente artigo relata a padronização e a aplicação de um método de diagnóstico de PIF baseado em PCR do gene codificador da proteína S do FIPV. Amostras de efusão pleural ou peritoneal de 11 gatos e 1 leoa e amostras de soro sanguíneo de 10 gatos com efusão cavitária foram enviadas ao Laboratório de Virologia da FMVZ-USP. Das 22 amostras testadas, apenas uma, referente a uma efusão pleural, mostrou-se positiva pela PCR. Hipóteses ligadas ao diagnóstico clínico, à dinâmica da infecção viral e a características intrínsecas das amostras podem ser utilizadas para explicar o número de amostras negativas. A técnica de PCR aqui descrita apresenta-se como uma alternativa para o diagnóstico da peritonite infecciosa dos felinos. Aliada aos diagnósticos sorológico e histopatológico, é uma ferramenta que vem ajudar a esclarecer a etiologia e a epidemiologia da doença em diversas espécies, permitindo um entendimento da cadeia de transmissão e da dinâmica e patogenicidade virais e da necessidade de vacinas.

PALAVRAS-CHAVE: Peritonite. Felina. Diagnóstico. PCR.

SUMMARY

Feline infectious peritonitis (FIP) is usually a fatal disease of wild and domestic felines. The etiologic agent of FIP (FIPV, Feline Infectious Peritonitis Virus) is a coronavirus, an enveloped single-stranded RNA virus of the family *Coronaviridae*. This paper reports the standardization and application of a diagnostic test to FIP based on PCR targeted to FIPV S gene on either pleural or peritoneal effusion samples of 11 cats and one lioness, and serum samples of 10 cats with cavitary effusion. Only a cat's pleural effusion out of the 22 samples tested was positive by PCR. Hypothesis related to clinical diagnosis, viral infection dynamics and intrinsic feature of the samples may explain the number of negative results. The PCR technique described here is an alternative to direct diagnosis of infectious peritonitis. It can elucidate the

^{1*} Bióloga, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal – FMVZ – USP. Avenida Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87. Cidade Universitária. CEP.05508-900. São Paulo, SP. E-mail: giginmonteiro@terra.com.br.

² Médico Veterinário, Pesquisador Científico, Instituto Pasteur de São Paulo.

³ Médica Veterinária, pós-graduanda, Instituto de Ciências Biomédicas, USP.

⁴ Médico Veterinário, Pesquisador Científico, Instituto Biológico de São Paulo.

⁵ Médica Veterinária, pós-graduanda, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, FMVZ-USP.

⁶ Médico Veterinário, pós-doutorando, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, FMVZ-USP.

⁷ Médico Veterinário, Professor Doutor, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, FMVZ-USP.

⁸ Médica Veterinária, pós-graduanda, Departamento de Patologia, FMVZ-USP.

⁹ Professor Titular, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, FMVZ-USP.

etiology and epidemiology of this disease when used in conjunction with serological and histopathological diagnosis, therefore allowing a better comprehension of transmission, viral dynamics and pathogeny, and the need for vaccines.

KEY-WORDS: Peritonitis. Feline. Diagnosis. PCR.

RESUMEN

La peritonitis infecciosa felina (PIF) es una enfermedad, generalmente fatal, de felinos salvajes y domésticos. El agente etiológico de la PIF (Feline infectious Peritonitis Virus, FIPV) es un coronavirus; un RNA virus con envoltura de cinta simple de la familia *Coronaviridae*. El presente artículo relata la estandarización y aplicación de un método de diagnóstico de PIF basado en PCR del gen codificador de la proteína S del FIPV. Muestras de efusión pleural o peritoneal de once gatos y una leona, y muestras de suero sanguíneo de diez gatos con efusión pleural cavitaria fueron enviadas al Laboratorio de Virología de la FMVZ-USP. De las 22 muestras testadas apenas una, referente a una efusión pleural, fue positiva por PCR. Hipótesis relacionadas al diagnóstico clínico, a la dinámica de la infección viral y a características intrínsecas de las muestras pueden ser utilizadas para explicar el número de muestras negativas. La técnica de PCR aquí descrita, se presenta como una alternativa para el diagnóstico de peritonitis infecciosa felina. Aliada a los diagnósticos serológico e histopatológico, es una herramienta que ayuda a aclarar la etiología y la epidemiología de la enfermedad en diversas especies, permitiendo el entendimiento de la cadena de transmisión y de la dinámica y patogenia viral y de la necesidad de vacunas.

PALABRAS-CLAVE: Peritonitis. Felina. Diagnóstico. PCR

A peritonite infecciosa de felinos (PIF) é uma doença de incidência mundial, geralmente fatal, piogranulomatosa, imunomediada de felinos selvagens e domésticos (EVERMAN et al., 1981, HERREWEGH et al., 1995, FERH et al., 1997, GAMBLE et al., 1997, GUNN-MOORE et al., 1998a). O agente etiológico da PIF, o Vírus da Peritonite Infecciosa Felina (FIPV), é um coronavírus, um vírus envelopado com RNA fita simples, do Grupo 1 do gênero *Coronavirus*, família *Coronaviridae* (HERREWEGH et al., 1995, GAMBLE et al., 1997, KENNEDY et al., 2001).

Os coronavírus felinos (FCoVs) são bem diferentes entre si e em seus potenciais patológicos. A PIF causa infecção em monócitos e macrófagos e dissemina-se para os órgãos pelo sangue, enquanto que amostras avirulentas de FCoV ficam restritas ao sistema digestório e não conseguem penetrar através do epitélio intestinal e linfonodos (HERREWEGH et al., 1995).

FCoVs são frequentemente detectados em gatos. Os anticorpos estão presentes em 80 a 90% dos gatos de gatis e em 10 a 50% dos gatos domésticos; porém, como apenas cinco de cada 12% dos soropositivos morrem por PIF, acredita-se que a maioria dos gatos esteja infectada com cepas avirulentas de FCoV (FERH et al., 1997). Certas populações de gatos parecem ser mais susceptíveis à PIF e fatores como a idade, estresse e carga viral influenciam o aparecimento da infecção (HERREWEGH et al., 1995). Sabe-se que 54% de todos os casos de PIF ocorrem em gatos com menos de 12 meses e 70% em gatos com menos de quatro anos (FERH et al., 1997). Há, porém, uma evidência circunstancial da ocorrência de casos assintomáticos em que gatos soropositivos saudáveis

podem ter experimentado uma infecção subletal de PIF (HERREWEGH et al., 1995).

A patogênese da doença é complexa, com imunidade celular desempenhando um papel protetor, enquanto que a resposta imune humoral é geralmente prejudicial, colaborando com a disseminação viral por opsonização e por resultar na formação de imunocomplexos. Os imunocomplexos são depositados em pequenos vasos sanguíneos, onde se fixam e ativam o complemento e são fagocitados por macrófagos. Macrófagos infectados, então, promovem reações teciduais imunomediadas pela interação de suas membranas celulares alteradas com anticorpos fixadores de complemento ou células T citotóxicas. A degeneração dos macrófagos infectados leva à liberação de novos vírus e componentes do complemento. Um ciclo vicioso de dano vascular mediado por complemento acontece, gerando componentes quimiotáticos e atraindo neutrófilos, os quais, então, liberam enzimas proteolíticas, levando a mais dano tecidual. Essas reações podem ser vistas como alterações degenerativas e proliferativas em paredes de vasos sanguíneos, particularmente nas camadas endoteliais e mediais de pequenas veias e artérias nas serosas peritoneal e pleural e no tecido conjuntivo intersticial de órgãos parenquimatosos (GUNN-MOORE et al., 1998a).

Como conseqüência, a PIF apresenta-se com uma serosite fibrogênica com grande acúmulo de fluido proteináceo nas cavidades do corpo, formações piogranulomatosas disseminadas, hipergamaglobulinemia e formação de imunocomplexos (GUNN-MOORE et al., 1998a).

O diagnóstico da PIF é dificultado em função de os sintomas gerais serem inespecíficos e incluem febre, perda de peso, anorexia e mal estar geral. As alterações clínico-patológicas também não auxiliam para o diagnóstico diferencial, podendo-se observar linfopenia, neutrofilia, anemia, hipoproteinemia, hipergamaglobulinemia, e hipoalbuminemia. Na forma clássica, PIF efusiva, esses sintomas são acompanhados de uma gradual distensão abdominal, com um fluido ascítico amarelo e viscoso. Existe também a PIF “seca” ou não efusiva, em que há pouca ou nenhuma presença de exsudato. Os problemas neurológicos e oculares presentes numa infecção por PIF “seca” também são observados em infecções bacterianas e por vírus outros que não o FIPV (HERREWEGH et al., 1995; ROTTIER, 1999).

Testes sorológicos não diagnosticam, necessariamente, uma infecção ativa e, ainda, podem apresentar reações cruzadas com outros coronavírus (GAMBLE et al., 1997). Um diagnóstico definitivo para a PIF pode ser feito por meio de exame histopatológico de biópsia ou material *post-mortem* (HERREWEGH et al., 1995). Outra alternativa é o emprego da reação em cadeia pela polimerase (PCR), que é capaz de identificar os ácidos nucleicos do FIPV (GUNN-MOORE et al., 1998b), aliando vantagens de um baixo limiar de detecção, rapidez de realização (24 a 48 horas), facilidade de colheita de material biológico e aplicabilidade a estudos epidemiológicos.

No presente artigo, relata-se a padronização de um método de diagnóstico baseado na PCR a partir de modificações do método descrito por Gamble et al. (1997), para a detecção do coronavírus causador da peritonite infecciosa felina em amostras de soro e efusão de animais com suspeita clínica de PIF.

O segmento do genoma escolhido para a amplificação foi o gene que codifica a proteína do peplômero S (“spike”), em função da existência de um polimorfismo entre o FIPV e o FCovs nesta região do genoma, o que impede reações cruzadas entre os “primers” utilizados e amostras de coronavírus que não sejam o FIPV (GAMBLE et al., 1997).

Para proceder-se o teste, amostras (uma amostra/animal) de efusão pleural ou peritoneal de 11 gatos e 1 leoa com suspeita clínica de PIF e amostras de soro sanguíneo de 10 gatos com derrame cavitário, clinicamente evidente, foram colhidas em seringas esterilizadas em um volume mínimo de 5,0mL e armazenadas a -80°C até o momento de seu processamento. Como amostra padrão positiva, foi utilizada a vacina Primucell FIP™ (Pfizer Animal Health™) diluída em meio 209 de cultivo celular (Biovet®) conforme as instruções do fabricante e, como padrão negativo, água ultrapura.

O RNA total das amostras foi extraído com Trizol reagent™ segundo as especificações do fabricante (Invitrogen™). O RNA extraído foi ressuspenso em 15μL de água com 0,01% de dietil-pirocarbonato (DEPC) e 7μL

deste foram denaturados a 95°C por 5 minutos. A seguir, foram adicionados a cada amostra tampão First Strand™ (Invitrogen™) em diluição 1:10, 1mM de cada dNTP (deoxinucleosídeo-trifosfato), 10mM dithiothreitol (DTT), 1pmol/μL de cada “primer” (senso FIP1 5’-CTACAGAGC TGT GGT ACA AC- 3’ e anti-senso FIP2 5’-TTC CAC TCAAGA CCA TAG AT- 3’) e 200U M-MLV Transcriptase Reversa™ (Invitrogen™) em um volume final de 20 μL. A transcrição reversa, ou síntese de DNA-complementar (c-DNA) foi realizada a 42°C por 60 minutos.

Para a primeira amplificação (PCR), foram adicionados 5μL de c-DNA ao PCR mix contendo tampão PCR Buffer™ (Invitrogen™) em diluição 1:10, 0,2mM de cada dNTP, 0,5pmol/μL de cada “primer” FIP1 e FIP2, 1,5mM de MgCl₂, 25,25μL de água ultrapura e 1,25U de Taq DNA polimerase para reação final de 50μL. A seguir, foram realizados 35 ciclos de 94°C por 3 minutos, 94°C por 1 minuto, 53°C por 1,5 minuto, 72°C por 3 minutos seguidos de 72°C por 10 minutos para a extensão final.

Na segunda amplificação (“nested”-PCR), foram adicionados 5μL da primeira amplificação ao “nested”-PCR mix contendo tampão PCR Buffer™ (Invitrogen™) em diluição 1:10, 0,2mM de cada dNTP, 0,5pmol/μL de cada “primer” (senso interno FIP3 5’-GGT AAT GCA CGT GGT AAA CC- 3’ e anti-senso interno FIP4 5’-CAC TGG TTG GAG GTG AAT TG- 3’), 1,5mM de MgCl₂, 25,25μL de água ultrapura e 1,25U de Taq DNA polimerase para reação final de 50μL, seguindo-se os mesmos ciclos descritos para a primeira amplificação. Ainda, como controle de “nested”-PCR, foi inserido um tubo contendo água ultrapura entre cada 3 amostras testadas, sendo estes também submetidos aos procedimentos descritos para a “nested”-PCR, com o intuito de se monitorarem contaminações por DNA amplificado.

Foram analisados 10μL do produto do “nested”-PCR pela eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídeo. As amostras positivas foram aquelas que apresentaram um fragmento de 170 pares de bases.

Para se verificar o limiar de detecção do teste, a amostra padrão foi diluída em água ultrapura em base dois até a diluição de 1:4096 e cada diluição foi submetida ao protocolo descrito acima.

No teste de limiar de detecção, a amostra vacinal mostrou-se positiva até a última diluição (1:4096), evidenciando a alta sensibilidade analítica do teste.

Das 22 amostras testadas, apenas uma, referente a uma efusão pleural, mostrou-se positiva pela PCR, bem como a amostra padrão incluída como controle positivo. Os controles negativos da reação e os controles inseridos na fase de “nested” mostraram-se negativos, demonstrando não ter havido contaminações.

Hipóteses ligadas ao diagnóstico clínico, à dinâmica da infecção viral e às características intrínsecas das amostras podem ser utilizadas para se explicar o grande

número de amostras negativas. O diagnóstico clínico inicial foi realizado pela sintomatologia apresentada pelos animais, podendo esta ter sido confundida com outras doenças que levam ao surgimento de derrames cavitários, tais como doenças hepáticas, hipoproteïnemia e neoplasias. Deve-se considerar, também, que a coleta das amostras pode ter sido realizada em uma fase da doença em que havia baixo título de vírus e partículas virais. Além disso, sendo o coronavírus causador da PIF um vírus RNA, pode ter havido sua degradação por ribonucleases encontradas nos exsudatos inflamatórios, os quais poderiam, ainda, ter inibido as enzimas transcriptase reversa e DNA-polimerase.

A técnica de PCR aqui descrita apresenta-se como uma alternativa para o diagnóstico direto da peritonite infecciosa felina, uma vez que os “primers” utilizados são específicos para o FIPV e o limiar de detecção da prova é extremamente baixo, tornando o diagnóstico altamente sensível. Aliada ao diagnóstico sorológico e histopatológico, é uma ferramenta que vem ajudar a esclarecer, além da etiologia, a epidemiologia da peritonite infecciosa felina em diversas espécies, auxiliando no entendimento da cadeia de transmissão, da dinâmica e da patogenia virais e da aplicabilidade e necessidade de vacinas.

O presente relato é baseado em um estudo preliminar, sendo ainda necessários estudos centrados na repetibilidade do teste apresentado e na comparação deste com outros testes disponíveis para a PIF para que se possa conduzir um diagnóstico seguro dessa enfermidade.

Com o método de PCR utilizado, demonstrou-se a existência do vírus causador da peritonite infecciosa felina em amostra biológica de efusão pleural, sendo este o primeiro relato de evidência desse vírus por diagnóstico direto realizado no Brasil.

ARTIGO RECEBIDO: Junho/2003
APROVADO: Março/2005

REFERÊNCIAS

EVERMANN, J. F., BAUMGARTNER, L., OTT, R. L., DAVIS, E. V., MCKEIRNAN, A. J. Characterization of a Feline Infectious Peritonitis Virus Isolate. **Veterinary Pathology**, v.18, p.256-165, 1981.

FEHR, D., HOLZNAGEL, E., BOLLA, S., HAUSER, B., HERREWEGH, A. A. P. M., HORZINEK, M. C., LUTZ, H. Placebo-controlled evaluation of a modified live virus vaccine against feline infectious peritonitis: safety and efficacy under field conditions. **Vaccine**, v.15, n.10, p.1101-1109, 1997.

GAMBLE, D. A., LOBBIANI, A., GRAMEGNA, M., MOORE, L. E., COLUCCI, G. Development of a “nested” PCR assay for detection of feline infectious peritonitis virus in clinical specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v.35, p.673-675, 1997.

GUNN-MOORE, D. A., CANEY, S. M. A., GRUFFYDD-JONES, T. J., HELPS, C. R., HARBOUR, D. A. Antibody and cytokine responses in kittens during the development of feline infectious peritonitis (FIP). **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.65, p.221-242, 1998a.

GUNN-MOORE, D. A., GRUFFYDD-JONES, T. J., HARBOUR, D. A. Detection of feline coronaviruses by culture and reverse transcriptase-polymerase chain reaction of blood samples from healthy cats and cats with clinical feline infectious peritonitis. **Veterinary Microbiology**, v.62, p.193-205, 1998b.

HERREWEGH, A. A. P. M., GROOT, R., 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 of Clinical Microbiology**, v.33, p.564-569, 1995.

KENNEDY, M., BOEDEKER, N., GIBBS, P., KANIA, S. Deletions in the 7a ORF of feline coronavirus associated with an epidemic of feline infectious peritonitis. **Veterinary Microbiology**, v.81, p.227-234, 2001.

ROTTIER, P. J. M. The molecular dynamics of feline coronaviruses. **Veterinary Microbiology**, v.69, p.117-125, 1999.