



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

RELAÇÃO ENTRE APRESENTAÇÃO CLÍNICA, CARGA VIRAL E A TITULAÇÃO DE ANTICORPOS NA PERITONITE INFECCIOSA FELINA

ANA LUÍSA DEODATO RIBEIRO MOTA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor José Manuel Chéu Limão Oliveira
Doutor Virgílio da Silva Almeida
Doutora Ana Isabel Simões Pereira Duarte
Dra. Joana Vidal Pontes

ORIENTADOR

Doutor Virgílio da Silva Almeida

CO-ORIENTADORA

Dra. Joana Vidal Pontes

2010

LISBOA



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

RELAÇÃO ENTRE APRESENTAÇÃO CLÍNICA, CARGA VIRAL E A TITULAÇÃO DE ANTICORPOS NA PERITONITE INFECCIOSA FELINA

ANA LUÍSA DEODATO RIBEIRO MOTA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor José Manuel Chéu Limão Oliveira

Doutor Virgílio da Silva Almeida

Doutora Ana Isabel Simões Pereira Duarte

Dra. Joana Vidal Pontes

ORIENTADOR

Doutor Virgílio da Silva Almeida

CO-ORIENTADORA

Dra. Joana Vidal Pontes

2010

LISBOA

AGRADECIMENTOS

Entre sabedoria popular, conhecimento científico, livros, amizade, pura diversão e trabalho árduo q.b. são tantas as pessoas (e não só) que enriqueceram este pedaço tão importante da minha vida e merecem ser incluídas nesta página, que se tornou complicado encontrar as palavras adequadas para a compor.

Em primeiro lugar quero agradecer ao meu orientador, o Professor Virgílio Almeida, pela sua orientação, ajuda e disponibilidade durante a realização deste trabalho e à minha co-orientadora, a Dr.^a Joana Vidal Pontes, por todos os ensinamentos teóricos, práticos, dicas e apoio ao longo do meu estágio no Hospital Escolar.

Depois ao Professor António Ferreira e ao Dr. Gonçalo Vicente por terem permitido realizar o meu estágio final no Hospital Escolar.

Agradeço muito à professora Ana Duarte, que sem ter nenhum vínculo oficial comigo, me ajudou de uma forma incansável na realização deste trabalho.

À minha *vet crew* que me acompanha desde 2004 e da ilha Terceira (por ordem alfabética): Carla, Diana F., Diana N., Fernando, Joana L., Joana R., Sandra, Tânia e Rui V., por estes anos (que não-de ser muitos mais) de animação, apoio, muito estudo, mas acima de tudo muita amizade!

À minha grande *sista*, Sofia, por tantas razões!

À *Conchinha*, a maior beneficiária da vocação da dona, mas que também ajudou ao servir de cobaia para o estudo de uma ou outra disciplina.

A todo o corpo clínico e funcionários do Hospital Escolar e outras colegas de estágio pelo companheirismo, especialmente Joana P., Catarina V. e Cláudia R. .

Ao Coro Juvenil da Cidade de Torres Vedras, por me distrair da Veterinária (às vezes quando não devia...).

À equipa da Pull & Bear – Colombo II, especialmente ao Rui A. que tantas vezes me fez desdramatizar as situações e melhorar as atitudes.

Aos outros dois elementos do trio, Ricardo F. e António A., por aliviarem as longas e torturantes horas de internamento.

Ao Professor João Barcelos e todos os outros professores dos Preparatórios de Medicina Veterinária da Universidade dos Açores, pela iniciação a este curso, mas em especial a esta profissão linda, e também aos professores da FMV por darem continuidade a este meu percurso.

À Sr^a Elisa da Biblioteca da FMV, por ter sido uma bibliotecária competente.

À Doutora Diane Addie pela simpatia que demonstrou e as ideias que me deu, não só para este trabalho.

Aos técnicos dos vários Laboratórios da FMV a que recorri, sempre com resposta para o que eu precisava.

Finalmente, aos meus pais e irmão, que embora cada um para seu lado, todos me apoiam à sua maneira.

RESUMO

Título: Relação entre apresentação clínica, carga viral e titulação de anticorpos na Peritonite Infeciosa Felina.

Resumo: A Peritonite Infeciosa Felina (PIF) é uma doença sistêmica, mais frequente em animais jovens e gatos provenientes de gatis, provocada pelo Coronavírus Felino (FCoV), um vírus RNA cadeia simples sentido positivo com envelope. A proteína S viral permite a diferenciação entre os dois serótipos do FCoV. O vírus é transmitido por via fecal-oral, atinge os enterócitos, onde se multiplica. O modo peculiar de replicação viral facilita o surgimento da mutação essencial, que cria a forma virulenta do FCoV, o vírus da Peritonite Infeciosa Felina (FIPV). A resposta imunitária celular é a única eficaz contra o FIPV. A resposta humoral não o é, podendo mesmo contribuir para o desenvolvimento da doença. A presença de derrames é característica da forma exsudativa da PIF, manifestando-se por dilatação abdominal e dispneia. Outros sinais menos específicos, como palidez das mucosas, icterícia, febre moderada ou anorexia e prostração costumam estar presentes. Na forma seca são comuns os sinais oculares e neurológicos, e também outros sinais inespecíficos. A PIF não induz alterações analíticas, sendo mais frequentemente notado anemia ligeira, linfopenia e hiperglobulinemia. Qualquer análise feita no derrame tem maior valor diagnóstico que no sangue. O diagnóstico definitivo só é possível através da detecção do FCoV em biópsias ou citologias por imunohistoquímica ou imunofluorescência. Existem, porém, testes laboratoriais que são relevantes e muito utilizados para se estabelecer um diagnóstico de PIF como o rácio A:G, o teste de Rivalta, o RT-PCR e a titulação de anticorpos.

Actualmente ainda não existe tratamento eficaz no combate à doença, sendo o desfecho invariavelmente fatal. A melhor forma de prevenir a PIF é evitar a infecção pelo FCoV, uma vez que também não existe vacinação útil.

A pequena amostra investigada neste estudo não permitiu atingir os objectivos, embora se tenha constatado uma tendência para gatos com PIF e com uma maior diversidade de sinais clínicos, apresentarem cargas virais mais elevadas quer nas fezes quer no líquido de derrame. Sugere-se a continuidade do estudo para confirmar esta tendência e para avaliar a resposta imunitária associada.

O FCoV serótipo I foi o mais encontrado nos gatos doentes, isolado ou em co-infecção com o serótipo II.

Palavras-chave: PIF, FCoV, Vasculite, Carga Viral, Resposta Imunitária

ABSTRACT

Title: Association between clinical presentation, viral load and antibody titre in Feline Infectious Peritonitis

Abstract: Feline Infectious Peritonitis (FIP) is a systemic disease, more common in young animals and cats from multi-cat households. The implicated agent is the Feline Coronavirus (FCoV), a positive sense single strand RNA enveloped virus. The S protein allows for the differentiation between the two virus serotypes. The FCoV is transmitted by faecal-oral route. Then the virus reaches the enterocytes where it replicates. The FCoV peculiar way to replicate facilitates the mutation which turns FCoV into its virulent form, the Virus of Feline Infectious Peritonitis (FIPV). The only way to defeat the virus effectively is through the cellular immune response. The humoral response can even contribute to the disease pathogenesis. The leakage of plasma leads to abdominal, thoracic and/or pericardial effusion, which are typical features of the FIP's wet form. The effusions may result in abdominal distension and/or dyspnoea. Other unspecific signs such as pale or icteric mucosal, moderate fever, anorexia and lethargy, are often showed by the patient. In the dry form of the disease, ocular and neurological sings may be present, along with other non specific signs. This disease doesn't have any characteristic analytic changes, although mild anaemia, lymphopenia and hyperglobulinemia are frequently reported.

Any exam has better diagnostic value if it is carried out on the effusion rather than on blood. Immunostaining of the FCoV antigen in macrophages (within tissue or effusion) is the only way to reach the definitive diagnostic. Even though positive results in exams like the A:G ratio, Rivalta's test and the determination of the antibody titre, reinforce the suspicion on FIP. Nowadays, there is neither an effective treatment nor a good vaccine. For these reasons the best way to avoid the fatal destiny of a cat with FIP is to prevent the infection with FCoV.

We weren't able to reach our main goals due to the small sample size of our sample. However we noticed that cats with FIP and more clinical signs showed higher viral load both in faeces and effusions. This experiment should continue to confirm this trend and to evaluate the associated immune response. The FCoV serotype I was the most frequently serotype found in cats with this disease, alone or associated with the FCoV serotype II.

Key Words: FIP, FCoV, Vasculitis, Viral load, Immune response

ÍNDICE GERAL

Declaração.....	i
Agradecimentos.....	ii
Resumo	iii
<i>Abstract</i>	iv
Índice Geral	v
Índice de Figuras	viii
Índice de Gráficos.....	x
Índice de Tabelas	xi
Lista de Abreviaturas	xii
Capítulo I: Peritonite Infecciosa Felina – Revisão Bibliográfica.....	1
1. Introdução	1
2. Caracterização do Coronavírus Felino (FCoV).....	1
3. Epidemiologia.....	4
3.1. Prevalência.....	4
3.2. Factores de Risco.....	5
3.3. Transmissão.....	7
3.4. Infecção.....	7
3.5. Excreção.....	8
3.6. Factores Virais.....	8
4. Fisiopatologia.....	9
4.1. FCoV nos enterócitos.....	9
4.2. Mutação.....	9
4.3. Entrada dos FIPV nos Macrófagos / Monócitos	11
4.4. Formação da lesão.....	12
5. Resposta Imunitária	14
5.1. Resposta Imunitária Humoral.....	14
5.2. Resposta Imunitária Celular	16
5.3. Evasão ao Sistema Imunitário.....	17
6. Apresentação Clínica.....	18
6.1. História Progressiva.....	18
6.2. Formas da Doença.....	19
6.2.1. PIF Exsudativa/Húmida	19
6.2.2. PIF Não-exsudativa/Seca.....	21
6.2.2.1. Cavidade Abdominal.....	21
6.2.2.2. Cavidade Torácica	22
6.2.2.3. Sistema Nervoso Central	22
6.2.2.4. Olhos.....	23
6.2.2.5. Outras localizações.....	24
7. Diagnóstico	25
7.1. Hemograma.....	25
7.2. Perfil Sanguíneo Bioquímico	26
7.2.1. Proteínas de Fase Aguda.....	27
7.3. Análise do Líquido de Derrame.....	28
7.3.1. Teste de Rivalta.....	30
7.4. Líquido Cefalorraquidiano e Humor aquoso.....	31
7.5. Imagiologia	31
7.5.1. Ecografia Abdominal	32
7.6. Testes Serológicos.....	34
7.7. <i>Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction</i>	36
7.7.1. RT-PCR no sangue	36
7.7.2. RT-PCR nas fezes.....	37
7.7.3. Outras aplicações do RT-PCR	37
7.8. Detecção do Antígeno nos Tecidos	38
7.8.1. Imunohistoquímica e Imunofluorescência Directa.....	38
7.9. Características Anatomo-histopatológicas	39

7.9.1.	Forma exsudativa	39
7.9.2.	Forma não exsudativa	41
8.	Tratamento	43
8.1.	Fármacos anti-virais	44
8.2.	Tratamento imunossupressor	45
8.3.	Interferão α Recombinante Humano	45
8.4.	Interferão ω Felino	45
8.5.	Outros tratamentos	46
8.5.1.	Inibidores da Tromboxano Sintetase	46
8.5.2.	Pentoxifilina	46
8.5.3.	Vitaminas e Anti-oxidantes	46
8.6.	Novas Perspectivas de Tratamento.....	47
8.6.1.	Poliprenil Imunoestimulante.....	47
8.6.2.	Compostos de Piridinil Imidazole.....	47
8.6.3.	Inibidores das Catepsinas	47
8.7.	Monitorização do Tratamento e Prognóstico	47
9.	Prevenção	48
9.1.	Vacinação	48
9.2.	Controlo da PIF em Gatis	49
Capítulo II: Trabalho experimental para determinação de relação entre apresentação clínica, carga viral e título de anticorpos na PIF		51
1.	Objectivos.....	51
2.	Materiais e Métodos	51
2.1.	População do estudo	51
2.2.	Recolha de Amostras	52
2.3.	Processamento das amostras	52
2.4.	Extracção de RNA	53
2.5.	Determinação das cargas virais	53
2.6.	Detecção e titulação de anticorpos.....	54
2.7.	Genotipificação do FCoV	55
3.	Resultados	55
3.1.	Apresentação Clínica (Grupo I)	55
3.1.1.	Caracterização da amostra.....	56
3.1.2.	Sinais Clínicos	56
3.1.3.	Alterações do Hemograma	58
3.1.4.	Alterações do Perfil Bioquímico Sanguíneo.....	59
3.2.	Carga Viral.....	59
3.2.1.	Grupo I.....	60
3.2.2.	Grupo II.....	61
3.2.3.	Grupo III.....	61
3.3.	Titulação de Anticorpos	63
3.4.	Determinação do Genótipo do FCoV	64
4.	Discussão	65
4.1.	Apresentação clínica (Grupo I)	65
4.1.1.	Características da amostra investigada.....	65
4.1.2.	Sinais clínicos.....	66
4.1.3.	Alterações do Hemograma	68
4.1.4.	Alterações do Perfil Bioquímico Sanguíneo.....	68
4.2.	Apresentação Clínica, Cargas virais e Titulação de Anticorpos.....	69
4.2.1.	Cargas Virais.....	69
4.2.2.	Titulação de Anticorpos e Cargas Virais	70
4.2.3.	Relação entre a Apresentação Clínica, Cargas virais e Titulação de Anticorpos	72
4.3.	Genotipificação do FCoV	74
5.	Conclusões.....	74
Bibliografia.....		77
Anexo I – Breve Descrição das Actividades de Estágio.....		88

Anexo II - Algoritmo diagnóstico de PIF.....	91
Anexo III – Nota informativa sobre Teste de Rivalta.....	92
Anexo IV – Ficha de Recolha de Dados	93

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Organização modelo dos Coronavírus: S – glicoproteína das espículas; M glicoproteínas transmembranares; E – glicoproteínas do envelope; N – fosfoproteínas da nucleocápside. Adaptado de http://www.sars-dtv.nl/SARS/Coronaviruses.html	2
Figura 2: Organização Genómica do FCoV tipo I. A Branco – Genes 3 e 7 (proteínas acessórias); a Cinzento – Genes das proteínas estruturais S, E, M e N); a Preto – Gene 1 (proteínas não estruturais/replicase). Adaptado de Tekes <i>et al.</i> (2008).	3
Figura 3: Piogranulomas na serosa de intestino de gato com a forma exsudativa da PIF. Imagem retirada de Sharif <i>et al.</i> , (2010).	13
Figura 4: Dilatação abdominal em gato com a forma húmida de PIF. Fotografia: Ana Mota. ..	19
Figura 5: Mucosas ictéricas em gato com PIF exsudativa. Fotografia: Ana Mota.	20
Figura 6: Precipitados queráticos na superfície ventral da córnea em gato com PIF seca. Fotografia: Ana Mota.	24
Figura 7: Aspecto de líquido de derrame abdominal drenado de gato com a forma exsudativa da doença. Fotografia: Ana Mota.	29
Figura 8: Aspecto de derrame positivo no teste de Rivalta. Imagem retirado de Newsletter April 2010 from Companion Animal Diagnostics / University of Glasgow, disponível em www.glasgow.ac.uk/vet/cad	30
Figura 9: Radiografia torácica projecção latero-lateral, evidenciando derrame pleural (seta). Imagem do Serviço de Imagiologia (Radiologia) do HEFMV, reproduzida com permissão do Prof. António Ferreira.....	31
Figura 10: Presença de líquido livre abdominal evidente cranialmente à bexiga em animal com forma exsudativa (seta). Imagem do Serviço de Imagiologia (Ecografia) do HEFMV, reproduzida com permissão da Dr. ^a Joana Pontes.....	32
Figura 11: Renomegália em animal com PIF exsudativa. Imagem do Serviço de Imagiologia (Ecografia) do HEFMV, reproduzida com permissão da Dr. ^a Joana Pontes.	33
Figura 12: Exemplo de Kit ELISA. Fotografia: Ana Mota.....	34
Figura 13: Aspecto de placa de ELISA no final da realização do teste. Fotografia: Ana Mota.	35
Figura 14: Derrame abdominal e deposição de fibrina nas serosas em gato com PIF exsudativa. Fotografia: Ana Mota.....	39
Figura 15: Corte da parede intestinal com evidência de colite e peritonite em gato com a forma exsudativa da PIF (x40; H&E). Imagem reproduzida com a permissão dos responsáveis pelo Laboratório de Anatomia Patológica – FMV.	40
Figura 16: Citologia obtida PAFF renal em que observa quantidade abundante de polimorfonucleares neutrófilos (setas brancas) e macrófagos (setas pretas) (x400; Giemsa). Imagens reproduzidas com a permissão dos responsáveis pelo Laboratório de Anatomia Patológica – FMV.	41
Figura 17: Deposição de fibrina sobre a cápsula de Glisson (peritoneu visceral) (x100; H&E). Imagem reproduzida com a permissão dos responsáveis pelo Laboratório de Anatomia Patológica – FMV.....	42

Figura 18: Curvas obtidas para as soluções diluídas do plasmídeo recombinante.....	54
Figura 19: Recta Padrão.	54
Figura 20: Esquema representativo das reacções RT-PCR e nPCR e tamanho dos respectivos produtos de amplificação. Imagem reproduzida com a permissão da Prof. Dra. Ana Duarte da FMV.	55
Figura 21: Curva de Amplificação de uma amostra positiva ao FCoV.	60
Figura 22: Curva de Amplificação de uma amostra negativa ao FCoV.....	60
Figura 23 (a, b e c): Migração dos fragmentos resultantes do RT-PCR e nPCR no gel de Agarose.	64
Figura 24: Teste de Rivalta positivo.	92

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Distribuição etária dos gatos afectados pela PIF.....	56
Gráfico 2: Distribuição dos animais afectados por sinais clínicos.	57
Gráfico 3: Distribuição das alterações do hemograma.....	58
Gráfico 4: Distribuição das alterações no perfil bioquímico da população.	59
Gráfico 5: Relação entre a carga viral e o título de anticorpos.....	71
Gráfico 6: Distribuição relativa das actividades durante o estágio curricular	88

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Distribuição relativa da distribuição dos derrames na forma exsudativa da PIF. Adaptado de Hartmann (2005).	20
Tabela 2: Variabilidade dos sinais clínicos da PIF nas duas formas (% de gatos afectados). Adaptado de Pedersen (2009).....	21
Tabela 3: Sugestões para o Controlo da PIF em Gatis. Adaptado de Addie, D. D., & Jarrett, O. (2006). Feline Coronavirus Infections. In <i>Infectious Diseases of the Dog and Cat , Revised Reprint</i> (3rd ed., pp. 88-103). St Louis, Missouri: Saunders.	50
Tabela 4: Características dos animais doentes.	56
Tabela 5: Sinais clínicos apresentados por cada animal.	57
Tabela 6: Alterações do hemograma apresentadas por cada gato.	58
Tabela 7: Alterações do Perfil Bioquímico Sanguíneo apresentadas por cada animal.	59
Tabela 8: Valores de Carga Viral obtidos das amostras dos animais incluídos no Grupo I.	61
Tabela 9: Valores de Carga viral dos animais incluídos no Grupo II.	61
Tabela 10: Valores de Carga viral obtidos dos animais incluídos no Grupo III.	62
Tabela 11: Distribuição dos animais por ordem de grandeza do valor da carga viral.	62
Tabela 12: Valores de Carga viral e títulos de anticorpos.	63
Tabela 13: Genotipificação do FCoV presente nas amostras (n=36).	63
Tabela 14: Compilação dos dados obtidos.	73

ABREVIATURAS

ADEI – Potenciação da Infecção Dependente de Anticorpos
AGP - Glicoproteína ácida α_1
AHAI - Anemia Hemolítica Auto-imune
ALT – Alaninaminotransferase
APN - Aminopeptidase-N
BID – duas vezes ao dia
CD - *Cluster differentiation*
CID – Coagulação Intravascular Disseminada
CMI – Resposta Imunitária Celular
Ct - *Treshhold Cycle*
DNA – Ácido Desoxirribonucleico
EV – via endovenosa
FAS – Fosfatase Alcalina Sérica
FCoV – Coronavírus felino
FeLV – Vírus da Leucemia Felina
FIV – Vírus da Imunodeficiência Felina
FMV – Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa
H&E – Hematoxilina e Eosina
HEFMV – Hospital Escolar da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa
HT – Hematócrito
IFN – Interferão
IgG – Imunoglobulina G
IL – Interleucina
IM – Via intramuscular
LCR – Líquido Cefalorraquidiano
mRNA – RNA mensageiro
nsp – proteínas não estruturais
ORF – *Open reading frame*
PAAF – Punção Aspirativa com Agulha Fina
pb – pares de bases
PIF – Peritonite Infecciosa Felina
PO – *Per os* / via oral
PT – Proteínas Totais
Ratio A:G – Ratio albumina:globulinas
RM – Ressonância Magnética

RNA – Ácido Ribonucleico
RT – PCR – *Reverse transcriptase polymerase chain reaction*
SC – Via subcutânea
SI – Sistema Imunitário
SID – uma vez ao dia
sIgA – Imunoglobulina A secretada
SNC – Sistema Nervoso Central
SRD – Sem Raça Determinada
TAC – Tomografia Axial Computorizada
TCB – Biópsia por *true-cut*
TGI – Tracto Gastrointestinal
TID – três vezes ao dia
TNF- α - Factor de Necrose Tumoral α
TNFR – Receptor do Factor de Necrose Tumoral
VCAM-1 – *Vascular Cell Adhesion Molecule 1*
VLA-4 - *Very Late Antigen-4*
VPN - Valor Preditivo Negativo
VPP - Valor Preditivo Positivo

1. Introdução

A Peritonite Infecciosa Felina (PIF) foi descrita pela primeira vez em 1963 por Holzworth (Pedersen, 2009). É uma doença sistémica induzida por uma forma virulenta do Coronavírus Felino (FCoV), a qual se pensa surgir através de uma mutação do vírus *in vivo*, e também por uma resposta imunitária deficiente do gato ao vírus (Norris, 2007; Addie, Belák, Boucraut-Baralon, Egberink, Frymus, Gruffydd-Jones *et al.*, 2009). A apresentação clínica é bimodal, pois pode manifestar-se na forma exsudativa ou húmida e na forma não exsudativa ou seca (Addie & Jarret, 2006).

Apesar dos inúmeros estudos e descobertas, a PIF continua a ser uma doença cujo diagnóstico é complicado, os tratamentos actuais são ineficazes (Hartmann & Ritz, 2008) e a única vacina existente tem uma eficácia reduzida (Patel & Heldens, 2009).

De seguida apresenta-se uma revisão dos conhecimentos actuais em relação à PIF.

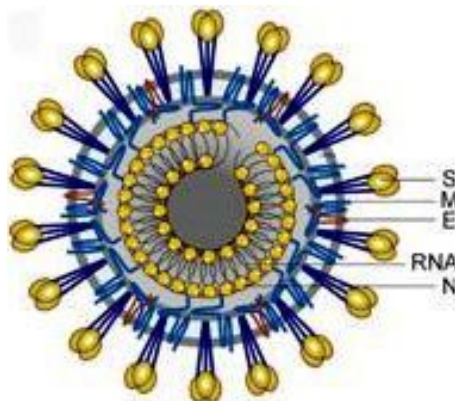
2. Caracterização do Coronavírus Felino (FCoV)

A PIF é pelo menos em parte provocada pelo Coronavírus Felino (FCoV) (Kennedy, 2009), o qual pertence ao género *Coronavirus* (ordem *Nidovirales*, família *Coronaviridae*) (Murphy, 1999). Neste género existem 3 grupos, o FCoV pertence ao Grupo I, onde também se inclui o Vírus da Gastroenterite Transmissível Suína (TGEV), Coronavírus Serótipo 229E da Bronquite Humana (HCoV 229E) e o Coronavírus Canino (CCV) (Knife, Griffin, Lamb, Straus, Howley, Martin *et al.*, 2007).

Os viriões do FCoV são partículas esféricas (120-140nm de diâmetro) com invólucro lipoproteico onde se inserem espículas (ou peplómeros) claviformes, longas e bem diferenciadas na superfície (Knife *et al.*, 2007) que lhes dão a aparência de coroa a que deve o nome (Quinn, Markey, Carter, Donnelly & Leonard *et al.*, 2002). O facto de possuir envelope é raro nos agentes patogénicos entéricos (Kennedy, 2009). O envelope é adquirido quando o vírus brota das membranas intracelulares (complexo de Golgi e retículo endoplasmático) após replicação no citoplasma (Stott, 1999; Knife *et al.*, 2007).

As principais proteínas do FCoV são a fosfoproteína básica N (Nucleocápside, 50kDa) e várias proteínas do envelope: a glicoproteína principal dos peplómeros S (180 kDa), a glicoproteína transmembranar M (25 a 30 kDa) e a proteína membranar secundária ou do envelope E (9 kDa) (Murphy, 1999) (Figura 1).

Figura 1: Organização modelo dos *Coronavirus*: S – glicoproteína das espículas; M - glicoproteínas transmembranares; E – glicoproteínas do envelope; N – fosfoproteínas da nucleocápside. Adaptado de <http://www.sars-dtv.nl/SARS/Coronaviruses.html>



A proteína S, responsável pela fixação celular (Quinn *et al.*, 2002; Horzinek, 2004), é o principal componente antigénico, ao possuir epítomos que induzem a produção de anticorpos durante a infecção natural (Quinn *et al.*, 2002) e aos quais também está dirigida a citotoxicidade celular (Stott, 1999; Groot-Mijnes, van Dun, van der Most & de Groot, 2005). Esta proteína possui dois domínios diferentes, S1 e S2, em que o primeiro é responsável pela ligação a um receptor celular e o segundo pela fusão membranar (Regan, Shraybman, Cohen, & Whittaker, 2008). Estes domínios são hipervariáveis o que facilita a produção de mutações capazes de iludir a resposta imunitária do hospedeiro (Quinn *et al.*, 2002; Rottier, Nakamura, Schellen, Volders & Haijema, 2005).

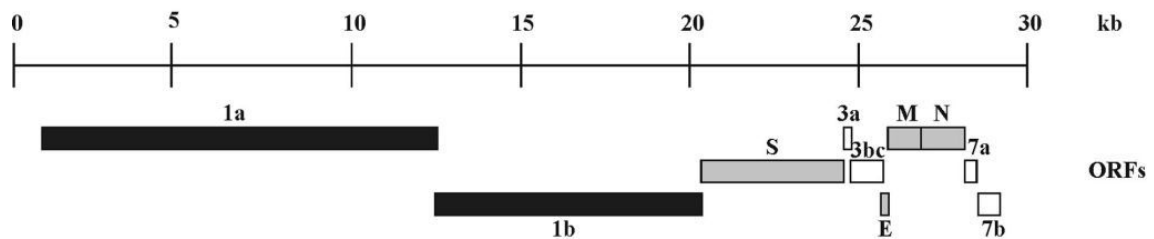
A glicoproteína M é uma molécula transmembranar inserida no envelope e a proteína estrutural mais abundante com importantes funções no *budding*; anticorpos contra a glicoproteína M podem neutralizar o vírus na presença do sistema complemento (Stott, 1999; Brown, Troyer, Pecon-Slattery, Roelke & O'Brien, 2009).

Além destas quatro proteínas estruturais, o genoma viral codifica também várias proteínas não estruturais (nsp), as quais ainda estão pouco caracterizadas (Manolaridis, Wojdyla, Panjkar, Snijder, Gorbalenya, Berglind, *et al.*, 2009).

Dentro do virião encontra-se o genoma: RNA de cadeia simples de sentido positivo com 29 kb (Pedersen, 2009). O RNA associa-se às fosfoproteínas básicas N formando a nucleocápside, longa, flexível e helicoidal (Knife *et al.*, 2007).

Mais de dois terços do genoma é ocupado por duas ORF (*open reading frames*) 1, as quais codificam as unidades da replicase (de Vries, Horzinek, Rottier, & de Groot, 1997; Herrewegh, Smeenk, Horzinek, Rottier & de Groot, 1998; Decroly, Imbert, Coutard, Bouvet, Selisko, Alvarez, Gorbalenya, Snijder & Canard, 2008). A jusante encontram-se os genes das proteínas estruturais e acessórias, os ORFs 3abc e ORFs 7ab, os quais podem estar deletados em algumas estirpes (Herrewegh *et al.*, 1998; Dye & Siddell, 2007) (Figura 2).

Figura 2: Organização genómica do FCoV Tipo I. A Branco – Genes 3 e 7 (proteínas acessórias); a Cinzento – Genes das proteínas estruturais S, E, M e N); a Preto – Gene 1 (proteínas não estruturais/replicase). Adaptado de Tekes, Hofmann-Lehmann, Stallkamp, Thiel & Thiel, 2008).



A expressão genómica começa com a tradução da ORF1a e da ORF1b. A ORF1a a montante codifica uma poliproteína de aproximadamente 450–500 kDa, a pp1a, enquanto a ORF1a e a ORF1b juntas codificam outra poliproteína de 750–800 kDa, a pp1ab (Dye & Sidell, 2005). As duas replicases poliproteicas resultantes são processadas por duas ou três proteases virais em 14 sítios dando origem a 16 produtos finais, as nsp, já referidas, 1 a 16 (Decroly *et al.*, 2008; Tekes *et al.*, 2008) e um sem número de produtos intermediários (Dye & Sidell, 2005).

Estes produtos da clivagem juntam-se formando um grande complexo enzimático, o complexo replicação-transcrição, que medeia todas as funções relacionadas com a replicação genómica e a síntese de mRNA subgenómico (Decroly *et al.*, 2008). O referido complexo localiza-se no citoplasma da célula infectada (Dye & Sidell, 2005) ligado à membrana dupla de estruturas retículo-vesiculares induzidas pela própria infecção (Manolaridis *et al.*, 2009). Pensa-se que as nsp3, nsp4 e nsp6 sejam responsáveis pela ancoragem do complexo enzimático às tais membranas (Manolaridis *et al.*, 2009).

Os coronavírus replicam-se através de um sistema único a que está associada a elevada frequência de recombinação (Knife *et al.*, 2007). Este fenómeno tem grande importância na evolução, pois constitui um mecanismo para a formação rápida de novas estirpes virais com tropismos e patogenicidade variados (Dye & Siddell, 2007).

Além do referido anteriormente, a falta de actividade revisora da polimerase durante a replicação também permite a acumulação de mutações e erros dando origem a variantes virais. Deste modo um indivíduo não está infectado por um único vírus, mas por uma população de vírus heterogénea intimamente relacionada entre si: *quasispecies* (Battilani, Coradin, Scagliarini, Ciulli, Ostanello, Prosperi, & Morganti, 2003). Num estudo (Battilani, *et al.*, 2003) demonstrou-se que a composição dos *quasispecies* correlaciona-se com a gravidade dos sinais clínicos e das lesões dos órgãos. A análise filogenética realizada no mesmo estudo mostrou evidência de separação das estirpes inócuas entéricas e das estirpes virulentas.

O FCoV pode ser dividido em dois serótipos diferentes: o tipo I e o II. Esta diferenciação é feita de acordo com a sua reactividade com anticorpos monoclonais específicos para a proteína S e a análise da sequência genética da mesma proteína (Addie & Jarret, 2006; Shiba, Maeda, Kato, Mochizuki & Iwata, 2007). Os dois serótipos diferem também na eficiência no

crescimento em culturas de tecidos, em que o tipo II tem uma performance melhor que o I (Addie & Jarret, 2006; Shiba *et al.*, 2007).

Além disto, o tipo II demonstra uma proximidade antigénica e genética considerável com os CCoV e TGEV, indicando que este tipo terá surgido de uma recombinação dupla entre o FCoV tipo I e o CCoV (Herrewegh *et al.*, 1998; Addie & Jarret, 2006; Shiba *et al.*, 2007), de tal forma que a proteína S do tipo II é muito semelhante à congénere do CCoV (Addie & Jarret, 2006).

O tipo I é mais diversificado que o tipo II, um fenómeno que pode dever-se à maior proporção de população infectada pelo tipo I e à possibilidade de persistência do vírus em gatos assintomáticos (Lin, Su, Wang, Hsieh, Chueh, & Chueh, 2008).

Ambos os serótipos têm a capacidade de induzir PIF, embora a maioria dos casos pareça estar associada ao tipo II (Kennedy, 2009).

Também são considerados dois biótipos do FCoV: o Coronavírus Felino Entérico (FECV), que causa apenas enterites ligeiras a moderadas (de Groot-Mijnes *et al.*, 2005), e o vírus da Peritonite Infecciosa Felina (FIPV) que causa PIF (Shiba, *et al.* 2007).

Tecnicamente o FCoV inclui todas as estirpes, serótipos (I e II) e biótipos (FECV e FIPV) (Pedersen, Allen & Lyons, 2008).

3. Epidemiologia

3.1. Prevalência

A infecção por Coronavírus felino é extremamente comum, ocorrendo por todo o mundo e em felídeos domésticos e selvagens (Kennedy, 2009; Pedersen, 2009). Apesar da elevada prevalência, apenas 5-12% dos animais seropositivos desenvolvem a doença (Addie *et al.*, 2009).

A prevalência de anticorpos anti-FCoV em gatos saudáveis determinada em vários estudos de campo pode variar entre os 14,6% no Japão e 70% na Áustria, com valores médios de 50% na Suíça (Benetka, Kubber-Heiss, Kolodziejek, Nowotny, Hofmann-Parisot & Mostl, 2004; Kummrow, Meli, Haessig, Goenczi, Poland, Pedersen, *et al.*, 2005) e de 34% na Austrália (Bell, Toribio, White, Malik & Norris, 2006).

Em gatis e centros de acolhimento a seroprevalência pode atingir 90% (Addie *et al.*, 2009), de tal forma que um gato originário de uma destas instalações tem duas vezes mais probabilidade de ser seropositivo que um gato que viva sozinho (Cave, Golder, Simpson & Addie, 2004). Pensa-se que isto reflecte a facilidade da transmissão fecal-oral do FCoV em ambientes onde vários gatos partilham o areão (Bell *et al.*, 2006).

Quando se comparam gatos domésticos com gatos ferais as opiniões divergem. Por exemplo: no Reino Unido foi descrita uma seroprevalência de 20% em gatos de vida livre, quase o dobro dos domésticos (11%) (Cave *et al.*, 2004). Outro estudo no Reino Unido calculou

uma seroprevalência mais elevada nos gatos ferais que nos domésticos, 41% e 21%, respectivamente (Muirden, 2002). Por outro lado, na Austrália, 34% dos gatos domésticos eram seropositivos, enquanto nenhum dos gatos errantes o revelou ser (Bell *et al.*, 2006). Também Luria, Levy, Lappin, Breitschwerdt, Legendre, Hernandez *et al.* (2004) na Califórnia, verificaram menor prevalência de anticorpos em gatos ferais (18.3%) que em gatos domésticos.

A discrepância entre os resultados dos diversos países pode ser justificada pelas diferentes densidades populacionais, (quanto menor a densidade, menor a probabilidade da transmissão fecal-oral e menor a carga viral), e pelo clima mais frio e húmido do Reino Unido, que possibilita uma sobrevivência mais prolongada do vírus no meio ambiente, além de estimular a procura de abrigos por parte destes gatos (Bell *et al.*, 2006).

O facto de os gatos ferais enterrarem as suas fezes, em vez de partilharem areões como os gatos domésticos, diminui a probabilidade de exposição e, conseqüentemente, o risco de infecção e de reinfecção (Luria *et al.* 2004; Bell *et al.*, 2006).

Em 2004, Benetka *et al.* (Áustria) determinaram que o tipo I do FCoV é mais frequente nos animais com PIF (86% positivos para o tipo I, 7% para o tipo II e 7% para ambos). Estes resultados colidem com os obtidos anteriormente no Japão (Hohdatsu *et al.*, 1992, citado por Benetka *et al.*, 2004), em que 30% dos gatos com PIF eram positivos ao FCoV tipo II, não estando este tipo presente em nenhum gato saudável. Mais recentemente, um estudo na Suíça, divulgou taxas de prevalência ligeiramente diferentes dos primeiros: tipo I 68%, tipo II 9% e ambos 23%, sendo o tipo I o maior causador de PIF (Kummrow *et al.* 2005).

Em Portugal, Duarte, Pereira da Fonseca, Almeida, Madeira de Carvalho, Meireles, Fazendeiro, *et al.* (2010) determinaram que 7,1% duma amostra de gatos errantes da Área Metropolitana de Lisboa excretavam o vírus nas fezes. Outro estudo realizado em Lisboa, no Hospital Escolar da FMV, estabeleceu que dos gatos infectados por FCoV, 79% possuía o tipo I, 3,5% o tipo II e em 17,5% dos casos não foi possível determinar o tipo de vírus (Duarte, Veiga & Tavares, 2009).

3.2. Factores de risco

A idade é um factor determinante de doença associado ao hospedeiro, uma vez que a maioria dos casos de PIF ocorre entre os 3 e os 16 meses (Pedersen, 2009), com 52% a 70% dos gatos a sucumbir até ao 1 ano de idade (Benetka *et al.*, 2004; Addie *et al.*, 2009).

Bell *et al.* (2006) verificaram uma distribuição bimodal da idade de manifestação da PIF: a maioria dos casos ocorria em gatos com menos de 2 anos de idade; detectaram um segundo pico, de menor magnitude, em gatos entre os 14 e os 15 anos. Barr (1998), citado em Quinn *et al.* (2002) também já tinha referido um pico de incidência de PIF a partir dos 10 anos de idade.

O risco de desenvolver PIF é maior nos gatos muito jovens, uma vez que a falta de maturidade do sistema imunitário (SI) permite uma replicação viral menos controlada nestes animais, facilitando a ocorrência da mutação viral (Hartmann, 2005). Pensa-se que o segundo pico de surgimento da doença esteja relacionado com o declínio da imunidade celular associado à idade, imunossupressão por doença concomitante ou terapia imunossupressora (estas duas últimas situações mais frequentes em animais mais velhos), que facilitam a replicação viral com consequente, maior probabilidade de desenvolver a doença (Bell *et al.*, 2006).

Num estudo efectuado por Pesteanu-Somogyi, Radzai & Pressler (2006), em que se avaliou a raça como factor de risco de PIF, verificou-se que prevalência da doença era maior em gatos de raça: 1,3% contra 0,35%. Algumas raças pareceram ter maior predisposição para a PIF, em particular o Birmanês, Ragdoll, Bengal, Rex (Cornish e Devon), Abissínio e o Himalaio. Outras raças como o Burmês, Exótico de Pêlo Curto, Manx, Persa, Azul da Rússia e Siamês não mostraram estar sob risco acrescido quando comparadas com gatos de raça indeterminada.

Este maior risco nalgumas raças ou linhagens familiares pode ser provocado pela concentração de factores hereditários predisponentes através de cruzamentos consanguíneos ou em populações fundadoras pequenas (Pesteanu-Somogyi *et al.*, 2006). No entanto, existem estudos que contrariam as raças anteriormente referidas como mais predispostas, pelo que se julga que a susceptibilidade estará mais ligada à linhagem familiar que à raça (Pedersen, 2009). Não se sabe ao certo que factor(s) determinante(s) de doença associados ao hospedeiro pode(m) estar implicado(s), mas devemos incluir o complexo maior de histocompatibilidade e os receptores dos linfócitos T (Kennedy, 2009).

Além dos factores inerentes à raça ou linhagem, estes gatos são mais frequentemente mantidos em gatis de criação, o que por si só constitui um ambiente de maior stress pelo maior número de animais, introdução regular de novos gatos e reprodução frequente. A maior densidade populacional destas instalações (Pesteanu-Somogyi *et al.*, 2006) e o facto de as crias excretarem mais vírus que os adultos (Pedersen, Sato, Foley & Poland, 2004) estão também relacionadas com uma maior exposição ao coronavírus por parte destes gatos.

O papel do género do animal e a importância da influência hormonal no SI, em particular na resposta mediada por células, ainda não são claros (Benetka *et al.*, 2004). No estudo de Rohrbach, Legendre, Baldwin, Lein, Reed & Wilson (2001) observou-se um risco maior para machos inteiros e menor para fêmeas esterilizadas. Investigações mais recentes corroboram estes resultados com 62.4% dos animais afectados sendo machos e 37.6% fêmeas (Benetka *et al.*, 2004). No entanto, Pesteanu-Somogyi *et al.* (2006) não encontraram diferenças significativas entre sexos.

O stress é também um factor predisponente, pelo que evitar situações como cirurgias, idas a gatis/hóteis, mudanças de meio ambiente ou traumas, é primordial no maneió de um gato

FCoV positivo (Addie *et al.* 2009). Outros factores, que têm sido menos vezes associados ao aumento do risco de doença, incluem a estação do ano (há mais casos diagnosticados no Inverno), co-infecção por FeLV e/ou FIV, e outras situações que comprometam a imunidade (Benetka *et al.*, 2004; Hartman, 2005).

3.3. Transmissão

As fezes são a maior fonte de FCoV e a principal via de transmissão é a fecal-oral, através do contacto com fezes ou fomites que contenham o vírus. (Addie *et al.*, 2009).

Além dos areões partilhados, também aerossóis expelidos, roupas, brinquedos, taças da comida para vários gatos ou *grooming* recíproco são possíveis meios de transmissão indirecta (Addie & Jarret, 2006; Addie *et al.*, 2009).

A transmissão através de pulgas e piolhos é improvável (Hartmann, 2005; Addie & Jarret, 2006). Apenas descrita numa gata que desenvolveu a doença durante a gravidez, a transmissão transplacentária é extremamente rara (Addie & Jarret, 2006).

3.4. Infecção

Os gatos infectam-se sobretudo por ingestão, mas também por inalação do FCoV (Addie & Jarret, 2006).

Em instalações de reprodução e criação, ou outro tipo de populações em que o FCoV seja endémico, os gatinhos são infectados muito precocemente. Desconhece-se a idade exacta mas poderá ocorrer logo antes das 2 semanas de idade ou então após as 4-6 semanas, associado à perda dos anticorpos maternos. A mãe é geralmente a fonte de infecção (Addie *et al.* 2009; Kennedy, 2009).

Num estudo em que se avaliou a excreção fecal por RT-PCR, 13% dos gatos infectados tornam-se portadores persistentes assintomáticos, provavelmente durante toda a vida (Addie & Jarrett, 2001). A detecção destes portadores requer resultados positivos de RT-PCR das fezes durante 9 meses (Addie & Jarret, 2006). Enquanto o animal estiver infectado a excreção será contínua (Addie *et al.*, 2009). A maioria dos restantes gatos fica apenas temporariamente infectada, de tal forma que depois de algum tempo, geralmente meses, os animais deixam de excretar o vírus e voltam a ser seronegativos. Podem voltar a ser reinfectados pela mesma estirpe ou por outra. Muito poucos gatos parecem ser naturalmente resistentes à infecção (Addie & Jarret, 2001).

Presume-se que o vírus seja mantido e disseminado na população por gatos persistentemente infectados, que além de actuarem como reservatórios do FCoV, podem também ser fonte de diferentes variantes do vírus (Addie & Jarret, 2001).

3.5. Excreção

A excreção do vírus faz-se essencialmente nas fezes, mas possivelmente também nas secreções respiratórias e na urina. No início da infecção, o vírus replica-se nas amígdalas e na orofaringe, sendo excretado na saliva (Addie & Jarret, 2006).

O vírus começa a ser excretado nas fezes até uma semana após a infecção (Pedersen, 2009), iniciando-se a excreção viral geralmente ao segundo dia (Addie & Jarret, 2006). A excreção ocorre a partir do íleo, do cólon e do recto e pode ser permanente até 18 meses ou mais, persistente até aos 4-6 meses e a partir daí intermitente, ou terminar ao fim de 6-8 meses (Pedersen *et al.* 2008 citado em Pedersen, 2009).

É possível que os padrões de excreção sejam diferentes para cada serótipo viral: estirpes laboratoriais do tipo II são excretadas apenas durante algumas semanas, enquanto na infecção natural os vírus do tipo I são excretados por 65% dos animais durante 2 a 3 meses e até mais em muitos casos (Addie & Jarret, 2006).

No estudo de Kipar, Meli, Baptiste, Bowker & Lutz (2010) determinou-se que o cólon é o principal local de persistência do FCoV e provavelmente também a maior fonte de excreção recorrente.

42% a 75% dos gatos com PIF excretam o vírus (Addie & Jarret, 2006), mas ainda não foi encontrado FCoV mutante causador de PIF nas fezes ou noutras excreções destes gatos doentes, pelo que a transmissão do vírus mutante é considerada improvável em condições naturais, embora seja possível por via iatrogénica (Hartmann, 2005).

O stress de entrar num gatil aumenta a excreção viral 10 a 10^6 vezes mais. No entanto, o stress da gravidez e da lactação não provocam este aumento (Addie & Jarret, 2006).

Gatos em gatis ou instituições de acolhimento estão sobre uma pressão de infecção elevada, pois o vírus pode estar a ser excretado por mais de 60% da população residente (Pedersen, 2009).

3.6. Factores virais

A virulência da estirpe é essencial, uma vez que nem todas possuem a capacidade de causar doença (Kennedy, 2009).

Os viriões do FCoV são sensíveis ao calor, sendo também rapidamente inactivados por solventes lipídicos, formaldeído, agentes oxidantes e detergentes não-iónicos (Quinn *et al.*, 2002). Na água, o vírus pode sobreviver aderente aos sólidos em suspensão (Gundy, Gerba & Pepper, 2009).

Os viriões do FCoV mantêm-se viáveis nas fezes durante 10 dias e podem persistir no meio ambiente durante 3 a 7 semanas (Arshad, 2010). Este período de sobrevivência permite que o vírus seja transmitido indirectamente através de fomites como areões, calçado, mãos e roupa e até durante exposições de gatos, embora não seja muito frequente (Hartmann, 2005; Addie *et al.*, 2009). A utilização de zeólitos de Cobre e Prata tem-se revelado bastante

eficaz na diminuição da contaminação de fomites, contribuindo assim para a não dispersão da doença (Bright, Sicairos-Ruelas, Gundy & Gerba, 2009).

4. Fisiopatologia

A PIF é reconhecida como uma doença crónica, cuja patogenia ainda não é totalmente compreendida (Groot-Mijnes, *et al.*, 2005). O FCoV é necessário para o seu desenvolvimento, mas é incapaz de causar a doença (Kennedy, 2009). Seja como for, sempre que existe infecção por FCoV, existe o risco potencial de PIF (Addie & Jarret, 2006).

4.1. FCoV nos enterócitos

O gato infecta-se com o FCoV por via oronasal (Addie & Jarret, 2006; Pedersen, 2009). O vírus atinge o intestino onde se replica no citoplasma dos enterócitos maduros do topo das vilosidades intestinais, causando infecção assintomática ou diarreia, conseqüente à morte dessas células (Kennedy, 2009).

Ao contrário do que se considerava anteriormente, o FECV consegue infectar os macrófagos e monócitos, embora não consiga manter a infecção: passa por uma fase de virémia ligeira e de curta duração, muito inferior à experienciada pelo FIPV (Dewerchin, Cornelissen, & Nauwynck, 2005; Can-Sahna, Soydal Ataseven, Pinar & Oguzoglu, 2007).

O vírus pode persistir no cólon e em muitos outros órgãos, principalmente nos macrófagos tecidulares, o que pode representar um fonte adicional de virémia (Kipar, *et al.*, 2010).

4.2. Mutação

A aquisição de tropismo para macrófagos/monócitos é crucial para o desenvolvimento da PIF (Rottier, Nakamura, Schellen, Volders & Haijema, 2005; Kennedy, 2009).

Existem vários estudos que tentam explicar esta alteração no tropismo do vírus. A teoria da “mutação interna” é, actualmente, a predominante e explica que o FECV sofre uma mutação nos enterócitos de um gato infectado, que lhe permite multiplicar-se dentro dos macrófagos e monócitos, difundindo-se depois por todo o corpo (Rottier *et al.*, 2005; Addie & Jarret, 2006; Addie *et al.*, 2009; Brown *et al.*, 2009).

A mutação é mais provável em animais em que a resposta imunitária não consegue conter a replicação viral, em particular em gatos jovens e imunocomprometidos (Hartmann, 2005; Pedersen *et al.*, 2008).

Dye & Siddell (2007) compararam sequências de RNA entre vírus presentes no jejuno e no fígado; a semelhança total entre ambas colocaria em causa a teoria anterior. No entanto, Chang, de Groot, Egberink & Rottier (2010) contradisseram o anterior, pois embora a excreção fecal de FIPV seja rara, pode ocorrer em resultado de lesões intestinais extensas, razão pelo qual o estudo prévio terá encontrado afinidade total entre os dois vírus.

A forma exacta como ocorre esta mutação ainda não está esclarecida: há estudos que sugerem que os determinantes da doença serão diferenças nas sequências da proteína da espícula viral (Rottier *et al.*, 2005), na proteína não estrutural codificada pelo gene 7b e/ou na proteína não estrutural codificada pelo gene 3c (Brown *et al.*, 2009). Provavelmente será um processo múltiplo envolvendo mutações tanto na proteína da espícula, como nos genes 3c e 7b.

Rottier *et al.* (2005) afirmam ser uma mutação na proteína da espícula, a responsável pela capacidade de infecção dos macrófagos, sendo a região da proteína S que medeia a fusão do envelope viral com a membrana plasmática durante a entrada do vírus (S2), o domínio crítico que confere tropismo para os macrófagos/monócitos.

Lin *et al.* (2009) realizaram um estudo em que se conclui que deleções no gene 7b estão presentes em ambos os biótipos, ou seja, a mutação que leva a essa deleção não se correlaciona com a patogenicidade.

Segundo Chang *et al.* (2010), o gene 3c está mutado na maioria dos gatos com PIF, mas não em todos, indicando que uma mutação nesse gene não pode ser a causa, ou pelo menos a causa única da doença. Sugerem ainda que o produto deste gene seja essencial à replicação nos enterócitos, mas que deixe de o ser quando o vírus sofre mutação. De tal forma que o vírus com esta mutação não se replica tão bem no tracto gastrointestinal, o que pode explicar não haver surtos de PIF como há de enterites por FECV.

Esta teoria da mutação interna tem sido alvo de várias especulações, por exemplo, em relação à localização da(s) mutação(ões) (Haijema *et al.*, 2004, Rottier *et al.*, 2005) e pelo facto de os dois biótipos não serem distinguíveis *in vitro* por métodos serológicos ou genéticos (Shiba *et al.*, 2007).

Uma hipótese alternativa à da “mutação interna” é a da “circulação virulenta/não-virulenta”, que sugere que ambos os biótipos circulam na população de gatos e que gatos susceptíveis aos biótipos virulentos desenvolvem a doença (Brown *et al.*, 2009).

Existe ainda outra corrente de pensamento que afirma que qualquer FCoV pode causar PIF, a carga viral e a resposta imunitária do indivíduo é que determinam se ocorre doença ou não (Addie *et al.*, 2009).

Provavelmente, a doença resultará tanto das características genéticas do vírus como da resposta imunitária do hospedeiro (Brown *et al.*, 2009; Addie *et al.*, 2009). De acordo com esta premissa está o facto de terem sido identificados vírus mutantes em 20% dos gatos infectados por FECV, indicando que mutantes com tropismo para os macrófagos aparecem com muita frequência, embora apenas uma pequena porção consiga despoletar a doença. Pensa-se que uma resposta celular rápida e eficaz consiga controlar a maioria das infecções a nível dos linfonodos mesentéricos (Pedersen, 2009).

O grau de infecção dos macrófagos e a replicação viral *in vitro* estão associados à virulência do biótipo do FCoV. Por esta razão é provável que o desenvolvimento da PIF esteja relacio-

nado com a extensão da infecção dos monócitos. Pensa-se também que os gatos passem por fases recorrentes de virémia associada aos monócitos com o desenvolvimento de novas lesões em cada fase (Kipar, May, Menger, Weber, Leukert & Reinacher, 2005).

Battilani *et al.* (2003) analisaram a composição dos *quasispecies* e a sua relação filogenética em gatos com infecção natural, determinando que quanto maior for a heterogeneidade, maior é a gravidade da doença, talvez por sobrecarga do SI do hospedeiro.

4.3. Entrada do FIPV nos Macrófagos/Monócitos

Como o serótipo II cresce melhor que o serótipo I em culturas de células, o processo de desenvolvimento da doença está mais estudado para o serótipo II, razão pela qual os resultados dos diversos estudos devem ser interpretados com cuidado (Pedersen, 2009).

A ligação do FIPV aos macrófagos/monócitos implica a interacção entre a proteína das espículas, mais propriamente entre o seu domínio S1, e os receptores celulares ou através de anticorpos (Huang, Bosch, Li, Li, Lee, Ghiran, Vasilieva, *et al.*, 2005; Regan *et al.*, 2008; Pedersen, 2009).

O receptor para o FCoV serótipo I permanece desconhecido mas pensa-se que será uma proteína da membrana dos enterócitos apicais. Quanto ao serótipo II sabe-se que utiliza uma enzima, a aminopeptidase-N espécie-específica (APN) (Addie & Jarret, 2006; Dye, Temperton & Siddel, 2007; Takano, Katada, Moritoh, Ogasawara, Satoh, Satoh, *et al.*, 2008). A APN (ou *Cluster differentiation* [CD] 13) é uma glicoproteína transmembranar presente nas membranas apicais das células epiteliais do tracto respiratório, entérico, células renais, sinapses e células do SI (monócitos, células dendríticas e granulócitos) (Tusell, Schittone. & Holmes, 2007).

A entrada do FIPV nos macrófagos/monócitos pode ser facilitada pela presença de anticorpos, através da ligação entre a porção Fc do anticorpo anti-proteína S e o receptor Fc na superfície dos monócitos/macrófagos (fenómeno conhecido por ADEI, ou potenciação da infecção dependente de anticorpos) (Regan *et al.* 2008; Takano *et al.*, 2008; Huisman, Martina, Rimmelzwaan, Gruters, & Osterhaus, 2009). Quando os anticorpos estão ausentes o FIPV infecta as células através do receptor APN, como já referido, o qual não está envolvido na ADEI (Takano *et al.*, 2008). O papel do ADEI nas infecções naturais ainda não é claro, uma vez que estudos de campo revelam que os gatos têm maior probabilidade desenvolver PIF num primeiro contacto com o vírus, quando à partida ainda não possuirão anticorpos (Addie *et al.*, 2009).

Após a fixação à superfície da célula, o vírus é internalizado por endocitose, não por fusão directa com a membrana plasmática, num processo independente de clavéola e clatrina, mas fortemente dependente de dinamina (proteínas intervenientes na endocitose e formação de vesículas nas células eucarióticas) (Van Hamme, Dewerchin, Cornelissen, Verhaselt & Nauwynck, 2008).

O que ocorre depois da entrada do vírus na célula-alvo ainda não é totalmente claro. Regan *et al.* (2008) propõem que após endocitose, o FCoV liberta o seu material genético através da fusão da membrana do endossoma com o envelope viral, activada por acção conjunta da descida da pH e de catepsinas. A descida de pH ocorre à medida que o endossoma amadurece, o que activa por si só a fusão e permite a activação das catepsinas, proteases de cisteína típicas do sistema endossoma/lisossoma. De entre os vários tipos destas enzimas, a catepsina B e a catepsina L, com maior importância para a primeira, demonstraram nesse estudo ser as activadoras da fusão (Regan *et al.*, 2008). A estirpe de FECV utilizada no estudo pareceu ser mais dependente de todo o processo no endossoma, do que as estirpes de FIPV, as quais foram detectadas mais cedo no citoplasma celular, escapando à digestão nos lisossomas (Regan *et al.*, 2008; Takano *et al.*, 2008). Estas diferenças poderão ajudar a explicar as propriedades patogénicas distintas dos dois biótopos.

4.4. Formação da Lesão

Durante os primeiros dias pós-infecção, a replicação do FIPV nos macrófagos ocorre de forma muito lenta. Quando há cura espontânea é neste estado quiescente inicial (Pedersen, 2009).

Ao fim de 10-21 dias dá-se um aumento dramático na replicação e na libertação de partículas virais, e infecção de novos macrófagos, com generalização sistémica do vírus associado aos monócitos (Norris, 2007; Pedersen, 2009). Esta disseminação depende do estado imunitário do hospedeiro, em particular da resposta imunitária celular (Takano, Hohdatsu, Toda, Tanabe & Koyama, 2007a).

Quando a infecção não é contida, o vírus espalha-se pelos linfonodos mesentéricos, serosas do intestino e em menor proporção na pleura e no omento. Alguns vírus conseguem atingir as meninges, especialmente na superfície caudal e ventral do cérebro, em redor dos ventrículos, dura-máter da medula espinal, úvea e retina (Hartmann, 2005; Pedersen, 2009).

Com a virémia começa a produção de anticorpos numa tentativa do organismo em debelar a infecção, embora sem eficácia como será explicado adiante (Groot-Mijnes *et al.*, 2005; Pedersen, 2009).

Ao atingir os tecidos alvo, os monócitos infectados começam por aderir às células endoteliais (Kipar *et al.*, 2005; Addie & Jarret, 2006). Esta adesão está facilitada pela forte expressão à superfície dos monócitos, de moléculas mediadoras da interacção com as células endoteliais (CD 18 ou integrina $\beta 2$), mas também pelo facto dos monócitos e macrófagos excretarem Interleucina (IL-) 1β e Factor de Necrose Tumoral (TNF-) α , citocinas que aumentam a expressão das adesinas endoteliais e assim, a adesão dos monócitos às células endoteliais. Toda esta dinâmica faz com que a PIF se desenvolva e persista através de reacções autócrinas e parácrinas (Kipar *et al.*, 2005). As células endoteliais também parecem contribuir para o desenvolvimento da vasculite através do aumento da expressão do

Complexo de Histocompatibilidade Maior (MHC) II e activação morfológica verificados durante a virémia associada aos monócitos. A expressão aumentada do MHC II pode ser estimulada pelo TNF- α (Kipar *et al.*, 2005).

Depois de terem aderido ao endotélio de pequenas vénulas, os monócitos libertam metaloproteinasas que enfraquecem as junções intercelulares endoteliais, permitindo a sua diapedese (e consequentemente, a entrada do vírus nos tecidos ao libertá-los quando morrem) e a extravasão de plasma (Kipar *et al.*, 2005; Addie & Jarret, 2006). O vírus libertado atrai anticorpos, complemento, mais monócitos e neutrófilos (Hartmann, 2005). Os monócitos diferenciam-se em macrófagos activados libertando citoquinas pró-inflamatórias, em particular enzimas vasoactivas, factores quimiotáticos e mediadores da inflamação. As primeiras provocam a retracção das células endoteliais, aumentando a permeabilidade vascular, o que permite o extravasamento de proteínas plasmáticas e a formação de um exsudado rico em proteínas (Hartmann, 2005; Addie & Jarret, 2006). Os factores quimiotáticos atraem novos monócitos que acabam também infectados, promovendo a continuidade da lesão (Dewerchin *et al.*, 2005). Os mediadores da inflamação activam enzimas proteolíticas que destroem os tecidos (Hartmann, 2005).

O resultado é o piogranuloma (Figura 3), ou seja, um processo inflamatório sob a forma de vasculite que se caracteriza por um infiltrado composto principalmente por macrófagos com presença de um exsudado rico em proteína (Kipar *et al.*, 2005; Pedersen, 2009). Nesta lesão, neutrófilos e linfócitos T constituem minorias e os linfócitos B encontram-se na periferia em redor dos infiltrados granulomatosos (Dewerchin *et al.*, 2005; Addie & Jarret, 2006; Pedersen, 2009). Esta última característica reflecte a longevidade do processo inflamatório, pois foi já demonstrado que os linfócitos B substituem progressivamente os macrófagos nos granulomas da PIF (Kipar *et al.*, 2005).

Figura 3: Piogranulomas na serosa de intestino de gato com a forma exsudativa da PIF. Imagem retirada de Sharif *et al.*, (2010).



O número crescente de linfócitos B e de plasmócitos a delimitar as lesões granulomatosas e de vasculite providencia novos anticorpos e a formação de complexos imunes. A activação do receptor Fc e do complemento aumentam a actividade fagocítica dos macrófagos e também a infecção de novos macrófagos (Kipar *et al.*, 2005).

Segundo alguns Autores (citados em Takano *et al.*, 2007a), a destruição tecidular associada ao FIPV deve-se principalmente à resposta dos próprios tecidos através de reacções de hipersensibilidade III (o tecido é destruído por enzimas libertados pelos leucócitos polimorfonucleares neutrófilos estimulados por deposição de imunocomplexos) ou tipo IV (citotoxicidade mediada por células).

O processo inflamatório da PIF restringe-se às veias, em particular às dos órgãos já referidos. Sabe-se que as células endoteliais venosas induzem uma adesão mais intensa dos leucócitos que as arteriais. Em alguns órgãos como o cérebro, as células endoteliais têm uma tendência reduzida para fixar linfócitos. No entanto, esta tendência inverte-se em resposta ao TNF- α e ao IFN- γ . O TNF- α estimula também o VCAM-1 das células endoteliais venosas, o que explica a restrição da inflamação às veias. O receptor do VCAM-1, o VLA-4, é uma β 1 integrina que não é expressada pelos neutrófilos, o que explica a pequena quantidade de neutrófilos presente no infiltrado inflamatório da vasculite por FIPV (Kipar *et al.*, 2005).

5. Resposta Imunitária

A imunidade na infecção por FIPV é complexa por várias razões, nomeadamente pelo facto de a imunidade humoral não ser importante para a protecção e, pelo contrário, poder contribuir para a patogénese da doença. Além disso, o tipo e a magnitude da resposta imunitária parecem determinar a forma que a infecção terá. Esta última afirmação é ainda uma hipótese, mas já existem várias provas de que uma resposta imunitária humoral forte e uma resposta celular fraca ou inexistente induzem a forma exsudativa da PIF e uma resposta humoral com uma resposta celular intermédia permitirá o desenvolvimento da forma não-exsudativa da doença. Finalmente, uma forte resposta imunitária celular evitará a doença (Pedersen, 2009).

5.1. Resposta Imunitária Humoral

Como referido anteriormente, os anticorpos na PIF parecem não conseguir bloquear a infecção, mesmo que os monócitos infectados expressem o antigénio viral à sua superfície (Dewerchin *et al.*, 2005), como será detalhado mais à frente.

Nesta doença, os anticorpos participam em dois processos que nada têm que ver com a resposta imunitária. Um destes processos é uma reacção de hipersensibilidade tipo-*Arthus* (tipo III), centrada nas pequenas vénulas, com vasculite, edema, migração de células infla-

matórias e necrose características, em resposta à presença de antígeno viral e IgG dentro das células mononucleares, fibrinogénio livre e C3 (Kipar *et al.*, 2005; Pedersen, 2009). Supõe-se que esta reacção se inicie com a deposição de complexos imunes nas paredes dos vasos, e posterior fixação do complemento levando ao desenvolvimento da lesão. Assume-se que os complexos sejam reconhecidos pelos macrófagos, mas que não sejam apresentados às células NK e que por isso não sejam destruídos (Kipar *et al.*, 2005). A deposição de complexos imunes ocorre principalmente em locais de elevada pressão sanguínea como o peritoneu, os rins e a úvea (Hartmann, 2005).

A presença de complexos imunes FCoV-específicos no sangue periférico e nos vasos glomerulares, associados aos títulos elevados de gamaglobulinas e C3, corrobora com o processo supra-referido (Kipar *et al.*, 2005). No entanto, também segundo Kipar *et al.* (2005) faltam evidências que confirmem este tipo de reacção no decurso da PIF, pois as IgG e os complexos imunes podem ficar presos inespecificamente, em especial em locais de necrose da parede dos vasos. Também o facto de as articulações e a pele serem raramente afectadas (Addie & Jarret, 2006) e de haver falta de envolvimento arterial e das vénulas pós-capilares fazem duvidar da natureza da reacção (Kipar *et al.*, 2005).

O outro processo em que os anticorpos intervêm é a potenciação da infecção mediada por anticorpos (ADEI). Este processo descreve o aumento do número de macrófagos infectados na presença de anticorpos, uma vez que as partículas virais cobertas por anticorpos ou por proteínas do complemento conseguem utilizar o receptor Fc dos macrófagos para os infectar (Hodatsu *et al.*, 1998 citado por Pedersen, 2009; Groot-Mijnes *et al.*, 2005). Este fenómeno é específico do serótipo viral e envolve anticorpos para epítomos das espículas, os quais são neutralizadores *in vitro* (Hodatsu *et al.*, 1998 citado por Pedersen, 2009). Embora importante em infecções experimentais, onde quanto mais virulenta é a estirpe, mais provável que utilize o ADEI, este evento não parece ser relevante nas infecções de campo. (Pedersen, 2009). Os anticorpos poderão não ser sempre prejudiciais: numa experiência realizada por Gonon, Duquesne, Klonjowski, Monteil, Aubert & Eloit (1999) em que se compararam os anticorpos presentes em gatos que eliminaram a doença ou que ficaram cronicamente infectados com o FECV, verificou-se que nos primeiros o título de anticorpos contra a glicoproteína S era 30 vezes superior aos gatos cronicamente infectados, sugerindo que os anticorpos podem favorecer a eliminação da infecção natural, não sendo um factor de risco para infecções crónicas.

Takano, Azuma, Hashida, Satoh & Hohdatsu (2009) descobriram que os linfócitos B são sobrestimulados a diferenciarem-se em plasmócitos durante a infecção pelo FIPV. Os macrófagos infectados produzem factores de sobrevivência dos linfócitos B, nomeadamente a IL-6 (que estimula a diferenciação em plasmócitos e inibe a apoptose dos linfócitos B), o ligando do CD40 (que inibe a indução da apoptose dos linfócitos B) e o factor activador dos linfócitos B pertencente à família do TNF- α (BAFF; inibidor da apoptose dos linfócitos B). A

expressão do gene Blimp-1 (*B-lymphocyte maturation protein -1*; principal gene responsável pela diferenciação em plasmócitos) também está aumentada.

A produção viral e a expressão de IL-6, ligando do CD40 e BAFF estão muito mais aumentados nos macrófagos infectados através do ADEI que nos infectados apenas pelo vírus (Takano *et al.*, 2009). Segundo estes Autores, quanto maior o número de macrófagos infectados maior a expressão do mRNA dos factores de diferenciação/sobrevivência dos linfócitos B, por esses mesmos macrófagos. Contudo esta última hipótese ainda não está provada.

5.2. Resposta Imunitária Celular

Segundo a revisão de Pedersen (2009) várias são as provas reunidas que apontam a imunidade celular como a resposta mais eficaz contra o FIPV.

Groot-Mijnes *et al.* (2005) definiram a eficácia da resposta inicial dos linfócitos T como determinante para a progressão da doença e em última análise, para o seu desfecho. Os gatos que sobrevivem à infecção têm os linfócitos T CD8⁺ activados contra a proteína S (espículas) que constitui o alvo principal destas células (Groot-Mijnes *et al.*, 2005).

A depleção das células T provocada na PIF ocorre muito cedo na infecção viral e correlaciona-se com a replicação viral. Groot-Mijnes *et al.* (2005) propuseram que esta depleção dos linfócitos T resulte numa imunodeficiência aguda.

Kiss, Poland & Pedersen (2004), reportam que a imunidade contra o FIPV está relacionada com um desequilíbrio entre o Factor de Necrose Tumoral- α , o Interferão- γ e as repercussões desse desequilíbrio nos linfócitos. Assim sendo, uma resposta TNF- α elevado/IFN- γ baixo favorece a doença e o inverso indica montagem de uma resposta imune eficaz.

O papel negativo do TNF- α foi recentemente documentado por Takano *et al.*, (2007a). Esta molécula libertada pelos macrófagos induz a apoptose dos linfócitos, particularmente dos T CD8⁺, essenciais na debelação da infecção. Deste modo uma sobreprodução de TNF- α é indicativa de um prognóstico reservado.

O TNF- α liga-se ao Receptor do Factor de Necrose Tumoral (TNFR), induzindo sinais de apoptose nestas células. Existem dois tipos deste receptor: TNFR1 que está directamente relacionado com a morte celular e TNFR2 que auxilia na transdução do sinal de apoptose. Não se sabe porquê, mas a expressão do mRNA destes receptores está aumentada nos linfócitos T, principalmente nos CD8⁺, sugerindo que estas células estão mais susceptíveis à apoptose induzida pelo TNF- α que as outras subpopulações de linfócitos (Takano, Hohdatsu, Hashida, Kaneko, Tanabe & Koyama, 2007b). A taxa de apoptose dos linfócitos B na PIF é inferior à dos linfócitos T (lembrar os factores de sobrevivência segregados pelos macrófagos) (Takano *et al.*, 2007b).

A apoptose dos linfócitos T ocorre principalmente nos linfonodos e baço, mas também no sangue periférico (Dean, Olivry, Stanton & Pedersen, 2003; Kipar, Meli, Failing, Euler, Schwartz, *et al.*, 2006).

As *mitogen-activated protein kinase* (MAPKs) são uma família de proteínas que servem como intermediárias na via de sinalização das células para processar e responder aos estímulos exteriores, através da regulação de factores da transcrição (Regan, Cohen & Whittaker, 2009). A infecção com o FIPV provoca uma activação rápida da via MAPK p38, processo que está relacionado com a produção das citocinas pró-inflamatórias: TNF- α e IL-1 β . Ainda não se conhece como o vírus faz esta activação, embora se saiba que a aminopeptidase N é uma porta para esta via, pelo que poderá ser durante a entrada do vírus na célula que a activação é feita (Regan *et al.*, 2009).

De acordo com Gelain, Meli & Paltrinieri (2006), o aumento da expressão das citocinas em particular da IL-1 β e do IFN- γ é indicativo da montagem de uma resposta imunitária protectora.

O aumento da expressão de citocinas pelos leucócitos do sangue periférico (Kiss *et al.*, 2004) ou o aumento do número de linfócitos a produzir IFN- γ no sangue e linfonodos está referido em gatos saudáveis que vivem em gatis em que a doença é endémica (Paltrinieri, Ponti, Comazzi, Giordano & Poli, 2003b; De Groot-Mijnes *et al.*, 2005). Pelo contrário, gatos com PIF não têm IFN- γ sérico aumentado, o que poderá reflectir a baixa expressão desta citocina pelos linfócitos periféricos (Gelain *et al.*, 2006) ou a diminuição do número de linfócitos no sangue ou nos linfonodos (Paltrinieri *et al.*, 2003a; De Groot-Mijnes *et al.*, 2005).

5.3. Evasão ao Sistema Imunitário

A presença de antígenos virais na superfície das células é importante para o reconhecimento e eliminação das mesmas por parte do SI (Dewerchin *et al.*, 2005).

Em gatos infectados com o FIPV, os monócitos podem escapar ao SI por não expressarem antígenos virais à superfície da célula, embora uma porção destas células o faça (Dewerchin *et al.*, 2005). Cornelissen, Dewerchin, Van Hamme & Nauwynck (2007) notaram que monócitos infectados pelo FIPV expressam o MHC I à superfície, mas sem apresentarem antígenos virais.

Segundo Dewerchin, Cornelissen & Nauwynck (2006) os anticorpos conseguem ligar-se aos antígenos virais que algumas células infectadas expressam à superfície, mas ao fazê-lo despoletam a internalização desses antígenos. A membrana plasmática fica então livre de proteínas virais e a célula infectada invisível ao SI, podendo continuar a produzir vírus sem ser eliminada, ou entrar num estado quiescente (Dewerchin *et al.*, 2006) que pode explicar o longo período de incubação que a doença por vezes demonstra (Dewerchin *et al.*, 2006).

Esta internalização depende de enzimas serina/treonina quinases, uma via até agora nunca descrita (Dewerchin, Cornelissen, Van Hamme, Smits, Verhasselt & Nauwynck, 2008).

Depois da internalização, os complexos antigénio-anticorpo fazem uma curta passagem pelos endossomas primários, acumulam-se nos secundários, deixando-os depois sem terem sido digeridos pelos lisossomas (Dewerchin *et al.* 2008).

Se a internalização dos antigénios pudesse ser bloqueada, a resposta humoral seria eficaz, contribuindo para a eliminação dos monócitos infectados (Cornelissen *et al.*, 2007; Dewerchin *et al.*, 2008).

Cornelissen, Dewerchin, Van Hamme & Nauwynck (2009) determinaram outro mecanismo de evasão viral: as células infectadas pelo FIPV conseguem sobreviver à lise pelo complemento mediado pelos anticorpos, não só pela ausência de expressão de antigénio à superfície, mas também através da inibição da lise celular mediada pelo complemento. A forma de se evadir do complemento pode ser através de proteínas codificadas pelo próprio vírus que sejam semelhantes às proteínas inibidoras da cascata de reacção ou pela actividade receptor Fc na proteína das espículas. Nenhuma destas hipóteses está comprovada.

6. Apresentação clínica

Após a infecção com o FCoV, o gato pode sofrer quatro possíveis destinos:

- ✦ desenvolver PIF (5-12%),
- ✦ ficar temporariamente infectado, excretar o vírus durante alguns meses, tornar-se seropositivo, deixar de excretar e serorreverter, ficando de novo susceptível à infecção (a maioria dos casos);
- ✦ tornar-se um portador para o resto da vida (13%);
- ✦ ser naturalmente resistente à infecção (pequena minoria) (Addie, 2005).

Como já foi referido anteriormente, a PIF é uma doença imunomediada, progressiva e fatal (Foley, Rand & Leutenegger, 2003), cujo diagnóstico é um desafio para os clínicos.

Uma boa anamnese, exame físico e uma escolha e interpretação adequadas dos testes de diagnóstico são a pedra angular do diagnóstico *ante mortem* (Diaz & Poma, 2009).

6.1. História pregressa

A história pregressa dos animais doentes revela frequentemente contacto com outros gatos no ano anterior, por exemplo em gatis, abrigos temporários, ou mais raramente em hospitais veterinários e em exposições (Addie & Jarret, 2006).

O período de incubação, em infecções naturais, é desconhecido e provavelmente dependerá do SI de cada animal (Hartmann, 2005). Geralmente os gatos com a forma húmida são levados ao veterinário 4 a 6 semanas depois de serem introduzidos numa casa nova, cirurgia electiva ou outra situação de stress (Addie & Jarret, 2006; Kennedy, 2009), enquanto os gatos com a forma seca podem aguentar durante meses e até anos (Addie & Jarret, 2006).

O risco de desenvolver PIF é maior nos primeiros 6 a 18 meses após a infecção (Hartmann, 2005; Pedersen, 2009).

A maioria dos casos ocorre em gatos jovens (geralmente com menos de 1 ano de idade), e mais frequentemente em raças puras (Addie & Jarret, 2006; Kennedy, 2009).

6.2. Formas da Doença

A apresentação clínica da PIF é extremamente variável, reflectindo a variabilidade da distribuição da vasculite e lesões piogranulomatosas, que pode afectar vários tecidos e órgãos, incluindo pulmão, fígado, baço, mesentério e cérebro (Addie *et al.*, 2009).

A PIF tem sido classificada sob duas formas principais: a exsudativa/húmida e a não exsudativa/seca (Addie *et al.*, 2009; Pedersen, 2009, Kennedy, 2009; Diaz & Poma, 2009). Há quem considere que estas duas formas são apenas modos extremos de apresentação, com a maioria dos animais a manifestar sintomas de ambas (Maxie, 2007; Addie *et al.*, 2009) e há quem refute que o mesmo gato não pode manifestar as duas formas da doença em simultâneo (Pedersen, 2009). Há ainda uma forma rara da doença descrita em gatos jovens com vômito e diarreia associados a lesões piogranulomatosas intestinais (Addie *et al.*, 2009).

6.2.1. PIF Exsudativa/Húmida

Esta é a forma mais frequente da doença, embora o número de casos da forma seca esteja a aumentar (Pedersen, 2009). De grosso modo tem-se esta como sendo a forma aguda, ocorrendo geralmente 4 a 6 semanas após a infecção ou a um evento stressante, apesar de poder ocorrer em casos terminais de PIF não-exsudativa/seca (Addie & Jarret, 2006).

A sua característica mais evidente é a acumulação de líquido nas cavidades corporais em $\approx 75\%$ dos casos, nomeadamente no abdómen, tórax e saco pericárdico (Gruffydd-Jones, 2009; Addie *et al.*, 2009) (Figura 4).

Figura 4: Dilatação abdominal em gato com a forma húmida de PIF. Fotografia: Ana Mota.



Num pequeno número de casos, o derrame pode estar restrito ao toráx (Addie & Jarret, 2006; Addie *et al.*, 2009) (Tabela 1). A inflamação pode afectar a túnica vaginal dos testículos provocando edema escrotal (Addie *et al.*, 2009).

Tabela 1: Distribuição relativa da distribuição dos derrames na forma exsudativa da PIF. Adaptado de Hartmann (2005).

Localização do derrame	Proporção de animais afectados
Abdominal	62%
Torácico	17%
Ambos	21%

No exame físico nota-se o abdómen dilatado, o qual pode estar doloroso, e a onda de fluido é facilmente induzida pela precursão (Addie & Jarret, 2006; Pedersen, 2009). Se o derrame também for torácico, o gato apresentará dispneia, taquipneia, abafamento dos sons cardíacos e até mesmo respiração ofegante e mucosas cianóticas (Hartmann, 2005; Addie & Jarret, 2006; Pedersen, 2009). A afecção do pericárdio pode levar à distensão do saco pericárdico pelo líquido de derrame, tamponamento cardíaco e insuficiência cardíaca (Pedersen, 2009). Em caso de derrame pericárdico há abafamento dos sons cardíacos e alterações no electrocardiograma (*electric alternans*, complexos QRS de baixa voltagem, elevação do segmento S-T [Martin, 2007]) e na ecocardiografia (Hartmann, 2005).

Os animais afectados podem estar alerta ou prostrados, a comer normalmente, com apetite aumentado ou anoréticos (Hartmann, 2005; Addie & Jarret, 2006).

Outros sinais possíveis são perda de condição corporal, atraso no crescimento no caso dos gatos jovens, mucosas pálidas ou ictéricas (Figura 5), febrícula ($\leq 39,5^{\circ}\text{C}$) ou febre flutuante - não responsiva a tratamento com antibióticos - e massas abdominais sentidas à palpação, reflectindo adesão do mesentério às vísceras e aumento dos linfonodos (Hartmann, 2005; Addie & Jarret, 2006). Raramente, pode ocorrer sinovite generalizada, com consequente claudicação, por deposição de complexos imunes e migração de monócitos/macrófagos infectados para as articulações (Pedersen, 2009).

Sinais oculares ou do SNC são pouco frequentes nesta forma da doença (Pedersen, 2009).

Figura 5: Mucosas ictéricas em gato com PIF exsudativa. Fotografia: Ana Mota.



6.2.2. PIF Não-exsudativa/Seca

Esta é a forma crónica da doença que ocorre semanas a meses após a infecção (Addie & Jarret, 2006). Representa um desafio mais complexo de diagnóstico, pois pode manifestar-se por sinais vagos e inespecíficos como febre, anorexia, perda de peso e prostração (Addie & Jarret, 2006). Estes podem ser mesmo os únicos sinais, especialmente nos estádios iniciais de desenvolvimento da doença (Hartmann, 2005; Norris, 2007; Addie *et al.*, 2009).

Sinais mais específicos dependem dos órgãos ou tecidos afectados pela vasculite e lesões piogranulomatosas (fígado, rins, pâncreas, baço, linfonodos abdominais, SNC, pulmões, TGI, olhos, pele e coração) (Norris, 2007; Addie *et al.*, 2009), estando geralmente afectado mais do que um sistema orgânico e, mais frequentemente, o TGI e o SNC (Norris, 2007) (Tabela 2).

Tabela 2: Variabilidade dos sinais clínicos da PIF nas duas formas (% de gatos afectados). Adaptado de Pedersen (2009).

Sinais clínicos decorrentes do envolvimento de:	PIF exsudativa/ húmida	PIF não exsudativa/ seca
Cavidade Peritoneal	58,0	32,0
Cavidade Pleural	11,0	1,1
Sistema Nervoso Central	-	23,0
Olhos	-	15,0
SNC e Olhos	-	8,5
Cavidade Peritoneal e SNC	1,9	-
Cavidade Peritoneal e Olhos	2,8	7,4
Cavidades Peritoneal e Pleural	22,0	4,3
Cavidades Peritoneal e Pleural e SNC	0,9	3,2
Cavidades Peritoneal e Pleural e Olhos	0,9	2,1
Cavidade Peritoneal, SNC e Olhos	0,9	2,1
Cavidade Pleural, SNC e Olhos	0,9	1,1

6.2.2.1. Cavidade abdominal

Os órgãos abdominais são locais frequentemente afectados por estas lesões (Addie *et al.*, 2009). As lesões na forma seca da PIF são maiores, mas em menor número e menos disseminadas que as da forma húmida, constituindo granulomas. Estas lesões tendem a progredir da serosa para o parênquima do órgão (Pedersen, 2009).

Os rins e os linfonodos mesentéricos são os mais afectados, com o envolvimento dos rins a manifestar-se por renomegália e/ou superfície irregular detectáveis à palpação. O aumento dos linfonodos e irregularidades nodulares noutras vísceras também são palpáveis, podendo

ser equivocadas com neoplasia (Hartmann, 2005; Addie *et al.*, 2009). As lesões abdominais podem estar associadas com dor abdominal localizada (Pedersen, 2009).

Lesões intra-murais no cólon e junção ileo-cecóclica são frequentes e estão geralmente associadas a diarreia e vômito crónico, podendo ocorrer também obstipação (Hartmann, 2005; Addie *et al.*, 2009). À palpação sente-se espessamento das ansas intestinais (Hartmann, 2005; Kennedy, 2009).

O gato doente pode ainda apresentar-se icterico, se houver envolvimento hepático (Hartmann, 2005; Addie & Jarret, 2006).

6.2.2.2. Cavidade torácica

Segundo Pedersen (2009) cerca de 12% dos animais doentes tem a cavidade torácica afectada (Tabela 2). Se os pulmões estiverem afectados com pequenos granulomas envolvendo a pleural e o parênquima pulmonar subjacente (Addie & Jarret, 2006; Pedersen, 2009), o animal pode apresentar-se dispneico e a radiografia torácica revelar aumento heterogéneo da densidade (Addie & Jarret, 2006). Pneumonia piogranulomatosa foi já reportada em alguns casos conduzindo a dispneia grave (Addie *et al.*, 2009).

6.2.2.3. Sistema Nervoso Central

Na forma seca, 25-33% dos gatos apresentam sinais neurológicos (Addie & Jarret, 2006; Pedersen, 2009), que variam de acordo com a localização e a gravidade das lesões, assim como com o envolvimento de outros órgãos (Pedersen, 2009; Diaz & Poma, 2009). Sinais multifocais são mais comuns, embora também surjam sintomas de lesão focal (Kent, 2009; Diaz & Poma, 2009).

O sintoma mais comum é a ataxia, depois nistagmus e por fim convulsões (Addie & Jarret, 2006). As convulsões são mais frequentes em animais com afecção do prosencéfalo; a sua ocorrência traduz lesão cerebral extensa e é um indicador de prognóstico reservado (Timmann, Cizinauskas, Tomek, Doherr, Vandeveldt & Jaggy, 2008).

Outros sinais possíveis são alteração do estado mental, de comportamento, tremores de intenção (Foley *et al.*, 2003; Addie & Jarret, 2006). Os gatos afectados por vezes demonstram sinais compatíveis com síndrome vestibular central incluindo *head tilt* e *circling*, ataxia vestibular, défices nas reacções posturais, além do nistagmus já referido (Kent, 2009; Pedersen, 2009).

Quando a lesão é localizada num nervo periférico ou na medula espinal pode haver parésia posterior, descoordenação, hiperestesia, convulsões e paralisia dos nervos trigémio, facial, braquial e ciático (Addie & Jarret, 2006; Pedersen, 2009).

O vírus entra no SNC por via hematogénica através dos macrófagos infectados (Hartmann, 2005), com posterior recrutamento de células inflamatórias e secreção de citocinas (Foley *et al.*, 2003). A forma neurológica da doença consiste em meningite, ependimite, periventri-

culite (com acumulação de debris celular nos ventrículos) e coroidite, podendo conduzir a uma hidrocefalia por obstrução do fluxo do líquido cefalo-raquidiano (LCR) (Foley *et al.*, 2003; Timmann, Cizinauskas, Tomek, Doherr, Vandeveldel & Jaggy, 2008; Kent, 2009). Num estudo (citado em Hartmann, 2005 e Addie & Jarret, 2006) sobre o envolvimento neurológico da PIF, 75% dos animais apresentava hidrocefalia (macro ou microscopicamente) detectável na Tomografia Axial Computorizada (TAC) e Ressonância Magnética (RM). A hidrocefalia por si só pode levar a demência, alteração da personalidade ou convulsões (Pedersen, 2009).

6.2.2.4. Olhos

O envolvimento ocular é mais frequente na forma seca que na forma húmida da doença (Colitz, 2005; Pedersen, 2009). As manifestações oculares mais comuns são uveíte e coriorretinite, de tal forma que a PIF é considerada a principal causa destes sinais em gatos (Pedersen, 2009). Sinais de uveíte incluem alterações como o sinal de Tindall positivo (turbidez do humor aquoso pela presença de proteínas plasmáticas na câmara anterior, que resulta da quebra da barreira hemato-aquosa), hiperémia conjuntival e dos vasos ciliares anteriores, edema da córnea, diminuição da pressão intraocular, diminuição da capacidade visual, hifema, hipópion, espessamento da íris, precipitados queráticos, miose, dor/blefarospasmo e alteração da cor da íris (Colitz, 2005).

No entanto, estas lesões não são exclusivas da PIF, sendo necessário considerar doenças sistémicas como a toxoplasmose, FIV, linfossarcoma associado a FeLV, micoses sistémicas e trauma na lista de diagnósticos diferenciais (Hartmann, 2005; Addie & Jarret, 2006; Pedersen, 2009).

A úvea pode ser afectada pela deposição de complexos imunes e consequente inflamação imunomediada (Hartmann, 2005). A uveíte anterior, ou mais especificamente a irite, manifesta-se primeiramente pela alteração da cor da íris, em que toda ou apenas uma parte desta se torna castanha e olhos azuis se podem alterar para verde (Hartmann, 2005; Addie & Jarret, 2006; Pedersen, 2009). Esta inflamação pode também expressar-se através de outros sinais acima referidos (Colitz, 2005; Hartmann, 2005; Addie *et al.*, 2009).

No seguimento da inflamação, uma grande quantidade de fibrina, macrófagos e outras células inflamatórias depositam-se na parte posterior da córnea dando origem a precipitados queráticos característicos da PIF (Figura 5) (Colitz, 2005; Pedersen, 2009). Estes aparecem como depósitos ("*mutton fat*") no endotélio corneano ventral, os quais podem estar escondidos pela membrana nictitante (Hartmann, 2005; Addie *et al.*, 2009). Alguns gatos podem exhibir também edema e superfície nodular da íris, discoria ou anisocoria secundárias, perda repentina da visão e hifema (Hartmann, 2005; Addie e Jarret, 2006).

Figura 6: Precipitados queráticos na superfície ventral da córnea em gato com PIF seca. Fotografia: Ana Mota.



No exame do fundo do olho, observa-se coriorretinite, com *cuffing* perivascular (representando vasculite retiniana), que aparece sob a forma de linhas cinzentas difusas de cada lado dos vasos sanguíneos, descolamento retiniano linear e neurite óptica (Colitz, 2005; Hartmann, 2005; Addie & Jarret, 2006; Addie *et al.*, 2009).

Lesões focais semelhantes aos granulomas dos órgãos parenquimatosos ou piogranulomas podem ser visíveis na retina e na íris distorcendo a forma da pupila (Hartmann, 2005; Pedersen, 2009).

6.2.2.5. Outras localizações

Além das manifestações mais comuns já referidas, existem uma série de sinais reportados menos frequentes, nomeadamente na pele onde podem surgir lesões nodulares múltiplas e fragilidade cutânea na sequência de flebite e periflebite piogranulomatosa necrosante dérmica na PIF não-exsudativa (Cannon, Silkstone & Kipar, 2004). Pápulas intra-dérmicas não pruriginosas no pescoço e tórax provocadas por necrólise epidérmica tóxica na forma seca da doença também já foram registadas (Pedersen, 2009).

A doença pode afectar o tracto genital masculino, provocando orquite fibrinosa e necrosante crónica com consequente aumento dos testículos, não associado a edema escrotal da forma húmida (Pedersen, 2009) e priapismo, até como única lesão (Rota, Paltrinieri, Jussich, Ubertalli & Appino, 2008).

Vigani, Giordano & Travetti (2009) registaram um caso em que a apresentação da doença se deu sob a forma de um quisto mediastínico. Outras localizações menos frequentes para lesões secundárias ao FIPV são o nariz, língua e íleo (Pedersen, 2009).

7. Diagnóstico

O diagnóstico *ante mortem* de PIF continua a ser difícil e frustrante (Sharif, Arshad, Hair-Bejo, Omar, Zeenathul & Alazawy, 2010) pela falta de sinais clínicos específicos, de alterações bioquímicas patognomónicas e sensibilidade e especificidade baixas dos testes usados por rotina (Hartmann, 2005; Addie *et al.*, 2009; Sharif *et al.*, 2010).

Para tal, contribui o facto de as variantes virulentas do FCoV serem antigenicamente iguais e frequentemente geneticamente indistinguíveis das não virulentas, tornando difícil a construção de um teste de diagnóstico para as identificar (Norris, 2007). O único teste de diagnóstico definitivo continua a ser a histopatologia e quando mesmo assim for difícil de interpretar, a imunohistoquímica pode ser necessária (Addie, 2005; Pedersen, 2009) (Anexo II).

7.1. Hemograma

Os resultados hematológicos estão frequentemente alterados, sem que estas alterações sejam patognomónicas (Hartmann, 2005; Addie *et al.*, 2009).

Os leucócitos podem estar aumentados ou diminuídos (Hartmann, 2005; Addie *et al.*, 2009; Kennedy, 2009). A ocorrência de linfopenia com neutrofilia (“leucograma de stress”) é comum em animais com a doença. No entanto, também o é em muitas doenças sistémicas crónicas dos gatos (Hartmann, 2005; Norris *et al.*, 2005; Addie *et al.*, 2009; Sharif *et al.*, 2010).

Se for feita imunofenotipagem ou citometria de fluxo notar-se-á que a linfopenia se deve especialmente à depleção dos linfócitos T. De facto, uma contagem normal destes linfócitos tem um alto valor preditivo negativo (VPN) para PIF (de Groot-Mijnes *et al.*, 2005; Addie *et al.*, 2009).

Até 65% dos gatos afectados pode apresentar anemia, geralmente apenas com uma diminuição ligeira do hematócrito (HT) (Hartmann, 2005). Em alguns casos a anemia pode ser regenerativa, secundária a uma anemia hemolítica autoimune (AHAI) na qual podem ser detectados auto-anticorpos na superfície dos eritrócitos, com resultado positivo no teste de Coomb (Hartmann, 2005). Gatos com alterações intestinais graves apresentam corpos de Heinz nos eritrócitos, o que também leva ao aumento da hemólise (Hartmann, 2005; Addie & Jarret, 2006). Já foi descrito por alguns Autores anemia hemolítica fulminante, assim como trombocitopenia num estágio terminal (Norris, 2007).

Na maioria dos casos, em especial na forma seca da PIF, a anemia é não regenerativa (HT<30%) associada à inflamação crónica (Hartmann, 2005; Addie *et al.*, 2009).

Também é frequente detectar-se trombocitopenia em consequência da coagulação vascular disseminada (CID) despoletada pela vasculite (Hartmann, 2005; Pedersen, 2009), particularmente em casos terminais da doença (Maxie, 2007). Outros parâmetros que indicam CID, como os produtos de degradação do fibrinogénio e os dímeros D, estão também aumentados (Hartmann, 2005).

7.2. Perfil Sanguíneo Bioquímico

A distribuição das lesões é variável e, conseqüentemente, também as alterações nos parâmetros bioquímicos que as reflectem (Sharif *et al.*, 2010). Alterações do perfil bioquímico sanguíneo têm pouco valor de diagnóstico e podem nem ser observadas quaisquer modificações (Norris, 2007).

O dado laboratorial mais consistente é o aumento das proteínas séricas totais (PT), ocorrendo em 50% dos animais com a forma exsudativa da doença e em 70% dos gatos com a forma seca (Hartmann, Binder, Hirschberger, Cole, Reinacher, Schroo, *et al.*, 2003; Addie & Jarret, 2006; Pedersen, 2009; Sharif *et al.*, 2010). A hiperproteinémia deve-se principalmente ao acréscimo das globulinas, em particular das γ -globulinas (Hartmann, *et al.*, 2003; Addie *et al.*, 2009; Sharif *et al.*, 2010). Na sequência do anterior há uma diminuição do ratio Albumina:Globulinas (A:G) (Hartmann, *et al.*, 2003; Kennedy, 2009; Sharif *et al.*, 2010).

Nas infecções experimentais, verifica-se um aumento precoce das α_2 -globulinas, enquanto as γ -globulinas e o título de anticorpos sobem pouco antes do início da manifestação dos sintomas (Hartmann, *et al.*, 2003; Hartmann, 2005; Addie *et al.*, 2009).

A hipergamaglobulinémia e o título de anticorpos mostram uma correlação linear, mas a grande variedade de títulos para uma determinada concentração de γ -globulinas indica que outras reacções (imunomediadas) contribuem para a patogénese da PIF (Paltrinieri *et al.*, 1998 citado por Hartmann, *et al.*, 2003) e que outros factores, como o complemento ou anticorpos não específicos, e mecanismos como a IL-6 que induzem a activação de plasmócitos, contribuem para a elevação das globulinas (Hartmann, *et al.*, 2003).

As PT podem atingir concentrações altas de 12g/dl ou mais (Hartmann, 2005; Addie *et al.*, 2009). Se a quantidade de γ -globulinas for superior a 2,5g/dl, a especificidade do primeiro indicador para PIF é 86% (Norris, 2007). No entanto, deve-se ter em conta que um aumento das globulinas apenas reflecte estimulação antigénica crónica, a qual pode ter outras causas que não PIF, como doença periodontal, estomatite grave crónica, infecção crónica do tracto urinário, doença crónica do tracto respiratório superior, dirofilariose ou mieloma múltiplo (Hartmann, *et al.*, 2003; Norris, 2007).

A determinação do ratio A:G é uma ferramenta de diagnóstico útil, especialmente quando feito no derrame (Addie & Jarret, 2006), tendo muito maior valor diagnóstico que as PT séricas ou a concentração de γ -globulinas no sangue isoladamente (Addie *et al.*, 2009), pois não só o aumento da produção de γ -globulinas, mas também a diminuição da albumina, são características da PIF (Hartmann, 2005). A diminuição da albumina sérica está geralmente associada à diminuição de produção por insuficiência hepática ou *feedback* negativo pelas globulinas, e/ou à perda de proteína por glomerulopatia, secundária à deposição de complexos imunes, nos derrames durante vasculite ou por enteropatia exsudativa (Hartmann, 2005; Addie *et al.*, 2009).

O valor *cut-off* óptimo do ratio A:G é de 0,8 (Hartmann, *et al.*, 2003; Addie *et al.*, 2009). Assim sendo, se o gato doente tiver um ratio <0,8 a probabilidade de ter PIF é elevada (Valor Preditivo Positivo [VPP] de 92%), enquanto se o ratio for >0,8 é provável que não tenha a doença (Valor Preditivo Negativo [VPN] de 61%) (Hartmann, *et al.*, 2003; Addie *et al.*, 2009).

A electroforese das proteínas séricas pode mostrar um hipergamaglobulinémia, assim como um aumento das proteínas de fase aguda (Addie *et al.*, 2009; Pedersen, 2009). O valor de diagnóstico deste exame é baixo, pois a hipergamaglobulinémia na PIF pode ser mono ou policlonal, tal como nos mielomas múltiplos ou plasmocitomas (Hartmann, 2005; Addie & Jarret, 2006).

Outras alterações bioquímicas reflectem alterações nos órgãos afectados e não são especialmente úteis para o diagnóstico (Hartmann, 2005; Addie & Jarret, 2006).

As enzimas hepáticas alaninaminotransferase (ALT) e fosfatase alcalina sérica (FAS), apesar de aumentadas não o estão tanto como em outras doenças hepáticas, como a colangio-hepatite ou a lipidose hepática (Hartmann, 2005; Addie & Jarret, 2006).

Pode estar presente hiperbilirrubinémia, com ou sem evidência de icterícia, especialmente na forma húmida da PIF (Hartmann, 2005; Addie & Jarret, 2006; Pedersen, 2009). A PIF é mesmo considerada a causa mais frequente de plasma/soro icterico em gatos com menos de 3 anos (Pedersen, 2009).

Segundo Hartmann (2005), a hiperbilirrubinémia na PIF reflecte a necrose hepática, apesar do anteriormente referido, e que raramente é consequente da hemólise secundária a AHAI. No entanto Pedersen (2009), refere o contrário: para este Autor o aumento da bilirrubina em circulação não se deve tanto ao envolvimento hepático por si só, mas especialmente às microhemorragias e hemólise extravascular secundárias à vasculite e CID e ao facto de os gatos serem deficientes em transportadores da hemoglobina.

Na PIF, por vezes a bilirrubina está aumentada sem evidência de hemólise, doença hepática ou colestase, o que só é geralmente encontrado em gatos com sépsis (Addie *et al.*, 2009). Tem se especulado que o metabolismo e excreção da bilirrubina para o sistema biliar estejam comprometidos em animais com elevados valores de TNF- α , tal como na PIF, os quais inibem o transporte transmembranar (Hartmann, 2005; Addie *et al.*, 2009).

7.2.1. Proteínas de Fase Aguda

As proteínas de fase aguda são um grupo de glicoproteínas séricas que aumentam ou diminuem durante a inflamação. No caso da PIF, a glicoproteína α 1 ácida (AGP) e a proteína amilóide A sérica (SAA) são usadas para auxiliar o diagnóstico, pois ambas estão aumentadas na PIF, embora este aumento seja comum a outras doenças inflamatórias (Giordiano *et al.*, 2004; Paltrinieri *et al.*, 2007; Sharif *et al.*, 2010). Estas duas proteínas aumentam poucas

horas depois do início do estímulo inflamatório e permanecem aumentadas enquanto este durar (Pedersen, 2009).

No estudo de Giordano, Spagnolo, Colombo & Paltrinieri (2004) num abrigo endêmico para o FCoV, gatos assintomáticos infectados com o vírus revelaram aumento das proteínas de fase aguda, assim como da excreção e título de anticorpos, pouco antes da ocorrência de episódios de PIF, em simultâneo com gatos que acabaram por desenvolver a doença. No entanto, nos primeiros esse valor regrediu e nos doentes manteve-se, sugerindo a possibilidade destas proteínas de fase aguda terem alguma influência na patogénese da PIF.

A AGP é a principal proteína de fase aguda felina (Paltrinieri, 2007), sendo um agente anti-inflamatório e imunomodulador natural. Esta última função é afectada pela sua composição em hidratos de carbono, mais propriamente ácido siálico: a forma hiposializada induzida durante a inflamação (sialyl Lewis X) facilita as lesões provocadas pelo complemento e pelos neutrófilos. Além disso esta forma serve também como ligando entre os monócitos e as células endoteliais (Addie, 2004; Ceciliani, Grossi, Giordano, Pocacqua & Paltrinieri, 2004).

Segundo o estudo de Paltrinieri, Giordano, Tranquillo & Guazzetti (2007a), níveis séricos de AGP moderadamente aumentados (1,5-2mg/ml) podem distinguir PIF de outras doenças inflamatórias, enquanto níveis séricos superiores a 1500µg/ml-3mg/ml são quase inequívocos. Estes valores aplicam-se também a amostras de plasma e derrames (Pedersen, 2009). A SAA sérica tem também um efeito imunomodulador (Paltrinieri, 2008). A sua concentração aumenta precocemente na inflamação, especialmente na PIF, mas de uma forma menos evidente que nas outras espécies (Ceron *et al.*, 2005 citado por Paltrinieri, 2008). Esta proteína também se encontra aumentada na insuficiência renal, neoplasias, doença hepática e *Diabetes Mellitus* (Paltrinieri, 2008).

As concentrações de referência são inferiores a 20µg/ml, em gatos com PIF pode estar aumentada até 80µg/ml (Addie & Jarret, 2006).

7.3. Análise do Líquido de Derrame

Havendo derrame, o passo mais importante para o diagnóstico é a sua recolha, pois os testes feitos no líquido têm maior valor de diagnóstico que os mesmos testes feitos no sangue (Hartmann, *et al.*, 2003; Addie *et al.*, 2009; Sharif *et al.*, 2010).

O líquido drenado pode ter um aspecto límpido, cor de palha ou viscoso, que devido ao seu elevado teor proteico pode fazer espuma quando agitado ou formar flocos de fibrina (Addie & Jarret, 2006; Sharif *et al.*, 2010) (Figura 7). O líquido pode coagular quando refrigerado. Se a amostra estiver contaminada com sangue, pus, tiver um aspecto quiloso ou cheirar mal, então a PIF será improvável, embora em casos raros possa surgir com algum dos aspectos referidos, especialmente nos derrames torácicos (Hartmann, 2005; Addie & Jarret, 2006; Pedersen, 2009).

A presença de um líquido com estas características nas cavidades por si só não é diagnóstica (Hartmann, *et al.*, 2003; Addie *et al.*, 2009; Sharif *et al.*, 2010).

Figura 7: Aspecto de líquido de derrame abdominal drenado de gato com a forma exsudativa da doença. Fotografia: Ana Mota.



O derrame é classificado como transudado modificado, pelo conteúdo proteico muito elevado (>3,5g/dl), reflectindo a composição do soro, enquanto o conteúdo celular é moderado, aproximando-se dum transudado (<5000 células nucleadas/ml) (Addie & Jarret, 2006; Sharif *et al.*, 2010).

O conteúdo proteico pode variar entre 3,9 e 9,8 g/dl com as globulinas a representarem 50-82% do total (Pedersen, 2009). A medição do ratio A:G no líquido de derrame tem um valor preditivo elevado: um ratio A:G >0,8 permite excluir PIF quase com toda a certeza, enquanto valores entre os 0,4 e os 0,8 são duvidosos. Valores de ratio A:G <0,4, com níveis de proteínas maiores que 3,5g/dl e celularidade baixa (consistindo principalmente de neutrófilos e macrófagos) é praticamente diagnóstico de PIF húmida (Addie & Jarret, 2006).

Outras doenças como linfoma, insuficiência cardíaca, colangiohepatite e peritonite ou pleurisia bacteriana, podem dar origem a derrames semelhantes (Hartmann, 2005; Addie *et al.*, 2009).

A medição da actividade enzimática no derrame pode ser útil, uma vez que a lactato desidrogenase, enzima libertada pelas células inflamatórias, está tipicamente elevada (>300 UI/L) nos derrames causados pela PIF. Também a α -amilase costuma estar aumentada, provavelmente devido ao envolvimento pancreático, assim como a adenosina deaminase, um enzima responsável pelo metabolismo das purinas (Hartmann, 2005).

A citologia do derrame demonstra características piogranulomatosas, consistindo principalmente em macrófagos e neutrófilos, sobre um fundo densamente proteico (Hartmann, 2005; Addie *et al.*, 2009; Sharif *et al.*, 2010). Os neutrófilos geralmente são não-tóxicos, mas podem mostrar sinais de degeneração nuclear ligeira; linfócitos e plasmócitos podem também ser encontrados no esfregaço (Sharif *et al.*, 2010).

A aplicação da imunofluorescência nos esfregaços do líquido de derrame tem um elevado valor de diagnóstico, uma vez que através deste método podem ser detectados macrófagos com antígeno viral incluído (Hartmann *et al.*, 2003).

7.3.1. Teste de Rivalta

O teste de Rivalta (Anexo III) é um método simples e barato desenvolvido pelo investigador italiano Rivalta por volta de 1900, para diferenciar exsudados de transudado humanos (Hartmann, 2005; Addie *et al.*, 2009). Em Medicina Veterinária é útil para distinguir derrames provocados por PIF em gatos suspeitos (Hartmann *et al.*, 2003; Addie & Jarret, 2006; Addie *et al.*, 2009).

O procedimento consiste em encher um tubo com 5ml de água destilada, adicionar uma gota de ácido acético a 98% e homogeneizar. De seguida deitar uma gota do líquido de derrame na superfície da solução. Se a gota desaparecer e solução permanecer limpa o teste é considerado negativo, mas se pelo contrário mantiver a sua forma, aderir à superfície ou começar a afundar lentamente, o teste é considerado positivo (Figura 8) (Hartmann *et al.*, 2003). Este teste tem um alto VPP (86%) e um elevado VPN (97%) (Hartmann *et al.*, 2003).

A reacção positiva é induzida pelo grande conteúdo proteico do derrame e pelas elevadas concentrações de fibrinogénio e mediadores de inflamação presentes no derrame (Hartmann *et al.*, 2003).

O teste pode dar falso-positivo em gatos com peritonite bacteriana ou linfoma. Esses derrames podem ser distinguidos através de observação macroscópica, citologia e/ou cultura bacteriana (Hartmann *et al.*, 2003).

Figura 8: Aspecto de derrame positivo no teste de Rivalta. Imagem retirado de Newsletter April 2010 from Companion Animal Diagnostics / University of Glasgow, disponível em www.glasgow.ac.uk/vet/cad



7.4. Líquido Cefalorraquidiano e Humor aquoso

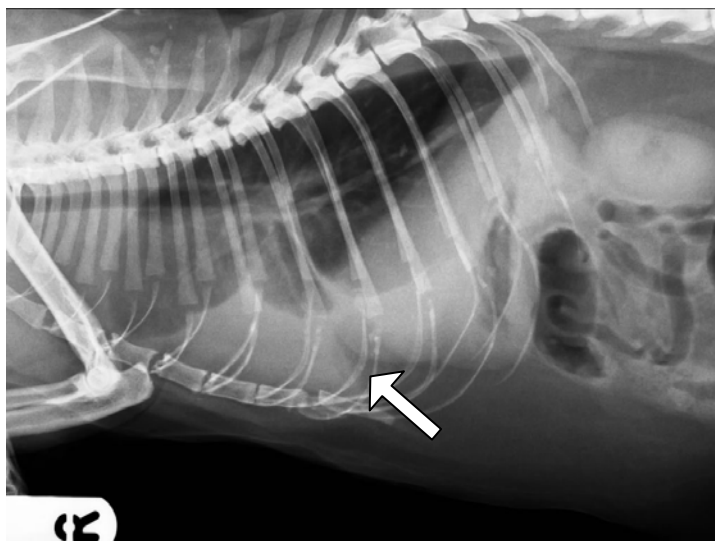
A análise do LCR de gatos com sinais neurológicos pode revelar o aumento do conteúdo proteico (56 a 348mg/dl, com o normal a situar-se a baixo dos 25mg/ml) e pleocitose (100 a 10.000 células nucleadas/ml – neutrófilos, linfócitos e macrófagos) (Addie & Jarret, 2006). Estes dados não são específicos (Addie *et al.*, 2009). Muitos gatos com sinais neurológicos causados por PIF têm análise de LCR normal (Hartmann, 2005; Addie *et al.*, 2009).

Alterações semelhantes (elevado conteúdo proteico e pleocitose) podem ser detectadas no humor aquoso dos gatos com uveíte por PIF (Addie & Jarret, 2006).

7.5. Imagiologia

O exame radiológico do gato doente pode mostrar derrame pleural (Figura 9), pericárdico e/ou abdominal, pela perda de detalhe da imagem, e ainda hepatomegália e renomegália. (Gruffydd-Jones, 2009; Sharif *et al.*, 2010). Linfadenopatia dos linfonodos mesentéricos pode dar origem a imagens de massa abdominais (Sharif *et al.*, 2010).

Figura 9: Radiografia torácica projecção latero-lateral, evidenciando derrame pleural (seta). Imagem do Serviço de Imagiologia (Radiologia) do HEFMV, reproduzida com permissão do Prof. António Ferreira.



A RM é útil para confirmar a presença de doença inflamatória no SNC indicada pelo LCR (Pedersen, 2009), permitindo a localização das lesões o que pode ajudar a diferenciar PIF de outras doenças inflamatórias (Negrin, Lamb, Cappello & Cherubini, 2007).

Nos gatos com PIF nota-se uma dilatação ventricular à RM, por obstrução ao fluxo do LCR, secundário ao envolvimento das meninges e epêndima, que pode também provocar o aumento da pressão intra-craniana e herniação cerebelar através do *foramen magnum*, e captação do meio de contraste pelo epêndima (Negrin *et al.*, 2007). O exame reflecte a distribuição histológica típica das lesões, em que as superfícies internas e externas do cérebro

são as mais afectadas (Negrin *et al.*, 2007). A ausência desses sinais não exclui a possibilidade de PIF (Negrin *et al.*, 2007; Norris, 2007).

7.5.1. Ecografia

De uma forma geral, à ecografia a forma exsudativa da PIF assemelha-se a uma peritonite clássica, enquanto a forma seca demonstra aspectos similares à carcinomatose (Baines, 2009).

A ecografia abdominal é um meio mais sensível que a radiografia para encontrar líquido livre (Mattoon & Nylan, 2002), permitindo confirmar a sua presença, mesmo em gatos com derrames ligeiros (Gruffydd-Jones, 2009). Este exame detecta volumes a partir dos 4ml/kg, os quais são mais facilmente detectados na região do ápex da bexiga e entre os lobos hepáticos (Mattoon & Nylan, 2002; Baines, 2009). O líquido é anecogénico podendo surgir com flocos de fibrina em suspensão (Gruffydd-Jones, 2009) (Figura 10).

Figura 10: Presença de líquido livre abdominal evidente cranialmente à bexiga em animal com forma exsudativa (seta). Imagem do Serviço de Imagiologia (Ecografia) do HEFMV, reproduzida com permissão da Dr.^a Joana Pontes.



Este meio complementar de diagnóstico permite também avaliar o pâncreas, fígado, linfonodos e rins (Sharif *et al.*, 2010), além de auxiliar na recolha de líquido para análise.

A renomegália é uma alteração frequente, podendo ser difusa ou multifocal. O rim pode apresentar-se com ecogenicidade normal, aumentada ou diminuída ou uma zona subcapsular hipoecogénica (o diagnóstico diferencial inclui: PIF, rim poliquístico e linfossarcoma) (Figura 11). A hiperecogenicidade difusa com boa transição córtico-medular (*rim medullary sign*) está descrita na nefrite piogranulomatosa provocada pela PIF, mas também no linfo-

sarcoma, nefrite glomérulo-intresticial e metástases de carcinoma das células escamosas (Biller, 2008; Lewis & O'Brien, 2010).

Figura 11: Renomegália em animal com PIF exsudativa. Imagem do Serviço de Imagiologia (Ecografia) do HEFMV, reproduzida com permissão da Dr.^a Joana Pontes.



O fígado pode mostrar-se normal ou com aparência heterogénea variável (Gruffydd-Jones, 2009). A ecogenicidade não costuma estar alterada. No entanto, o fígado pode estar hiperecogénico devido a lipidose hepática em animais anorécticos à consulta (Lewis & O'Brien, 2010).

Na maioria dos casos, o baço apresenta-se normal. Quando alterado está difusamente hipoeecogénico, associado a congestão passiva, hiperplasia linfóide, doenças inflamatórias sistémicas, infiltração neoplásica difusa ou hematopoiese extra-medular. Tanto o baço como o fígado estão afectados de forma difusa impedindo a identificação precisa de PIF (Lewis & O'Brien, 2010).

As lesões intestinais têm sido descritas como massas solitárias, espessamento da parede ou massas no íleo, válvula ileocecóclica ou cólon. O diagnóstico diferencial deve incluir linfadenopatia secundária a PIF, linfossarcoma e doença intestinal crónica (Lewis & O'Brien, 2010).

Segundo Lewis & O'Brien (2010), as alterações ecográficas na PIF não são específicas nem sensíveis para o fígado e baço. Dados concomitantes incluindo renomegália, contorno renal irregular e hipoeecogenicidade subcapsular, linfadenopatia abdominal, derrame peritoneal ou retroperitoneal e alterações intestinais reforçam a suspeita de PIF. De qualquer forma uma ecografia abdominal normal não exclui a possibilidade de infecção por FIPV.

A ecocardiografia é a técnica mais sensível para detecção de derrame pericárdico, permitindo por vezes visualizar o derrame pleural. O derrame pericárdico apresenta-se sob a forma

de um espaço hipocogénico em redor do coração entre o saco pericárdico e as paredes dos ventrículos. Outras alterações possíveis são a diminuição das dimensões internas dos ventrículos, movimentos balanceados do coração dentro do derrame e o aumento do contraste à volta do coração (Kienle & Thomas, 2002). Este exame permite também a detecção de massas e de outras anomalias cardíacas que possam justificar o derrame e descartar a PIF (Kienle & Thomas, 2002).

7.6. Testes Serológicos

A detecção de anticorpos contribui para o diagnóstico e o maneio terapêutico da doença quando bem executados e interpretados correctamente (Addie & Jarret, 2006). Os testes serológicos devem ser realizados em gatos com história pregressa, sinais clínicos e alterações laboratoriais (hemograma e perfil bioquímico sanguíneo) compatíveis com a PIF (Norris *et al.*, 2005; Addie & Jarret, 2006) mas o diagnóstico não pode basear-se exclusivamente nos mesmos (Hartmann, 2005; Pedersen, 2009).

Os testes utilizados devem ser quantitativos (determinam o título de anticorpos do animal), pois um teste serológico que apenas indique a presença de anticorpos não é útil no diagnóstico (Hartmann, 2005).

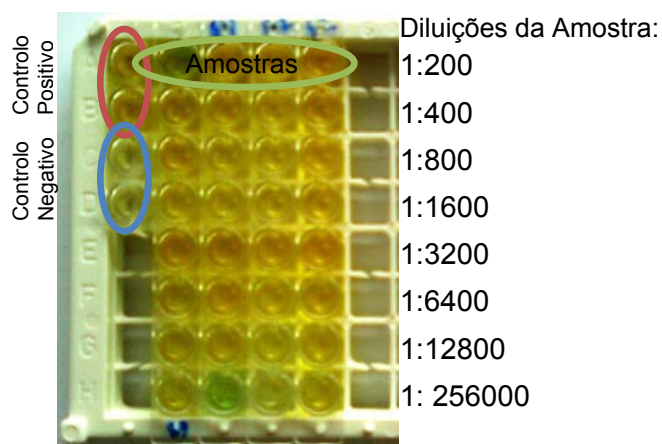
Muitos testes serológicos têm sido usados, incluindo a imunofluorescência indirecta (IFA), a neutralização viral (VN) e a prova de imunoabsorção enzimática (ELISA) (Figuras 12 e 13) (Pedersen, 2009).

Pratelli (2008) considera o método ELISA o mais sensível, mas afirma também que todos os testes citados serão equivalentes se realizados convenientemente. Por outro lado, Addie (2005) refere o método de IFA como o mais adequado.

Figura 12: Exemplo de Kit ELISA. Fotografia: Ana Mota.



Figura 13: Aspecto de placa de ELISA no final da realização do teste. Fotografia: Ana Mota.



Seja qual for o teste escolhido este apenas detectará anticorpos anti-FCoV, pois não é possível distinguir o biótipo viral desta forma (Hartmann, 2005; Pedersen, 2009; Kennedy, 2009). Houve já tentativas de criar um teste para detectar anticorpos anti-proteína 7b (Herrewegh, de Groot, Cepica, Egberink, Horzinek & Rottier, 1995). No entanto, estudos subsequentes demonstraram que a expressão da 7b ocorre na maioria das infecções, pelo que anticorpos anti-7b, em concentrações elevadas são compatíveis com gatos com PIF, mas também estão presentes em gatos saudáveis com FCoV (Kennedy, Abd-Eldaim, Zika, Mankin & Kania, 2008).

Na realização e, principalmente, na interpretação dos testes serológicos deve-se ter sempre em conta que uma grande proporção da população saudável é seropositiva, que títulos altos são frequentemente encontrados em animais assintomáticos e que a grande maioria dos animais seropositivos não desenvolverá a doença (Hartmann, *et al.*, 2003; Addie *et al.*, 2009).

De qualquer modo, considera-se que títulos muito elevados ($\geq 1:1600$) têm valor diagnóstico e são altamente sugestivos de PIF (Pedersen, 2009; Addie *et al.*, 2009) e que títulos baixos ($\leq 1:25$), médios ($\leq 1:400$) ou negativos tenham valor diagnóstico limitado (Hartmann, *et al.*, 2003).

É importante recordar que nem a presença de anticorpos indica PIF, nem a sua ausência a exclui (Kennedy *et al.*, 2008; Addie *et al.*, 2009).

Os títulos de anticorpos parecem aumentar progressivamente à medida que a doença passa de um estado subclínico para uma fase de sintomatologia evidente (Hartmann, *et al.*, 2003; Pedersen, 2009). Numa fase terminal os anticorpos podem diminuir drasticamente, especialmente em casos de PIF exsudativa fulminante. Além disto, alguns gatos com a forma húmida podem ter títulos baixos ou mesmo serem seronegativos, pois têm os anticorpos combinados com vírus, quando a carga viral é muito elevada, ou retidos nos derrames, o que os impede de serem detectados (Addie & Jarret, 2006; Addie *et al.*, 2009; Sharif *et al.*, 2010).

Apesar das limitações dos testes serológicos, pode-se considerar que um gato seronegativo não excreta o vírus, enquanto um em cada três gatos seropositivos o faz, e que gatos com maior índice de anticorpos têm maior probabilidade de excretar o vírus (Addie *et al.*, 2003; Addie & Jarret, 2006).

A determinação de títulos de anticorpos noutros fluidos corporais, que não o sangue tem sido investigada, nomeadamente nos derrames e no LCR, mas a sua interpretação é ainda complicada, pelo que não está recomendada (Addie *et al.*, 2009).

7.7. Reverse-Transcriptase Polymerase Chain Reaction

A *Reverse-Transcriptase Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) é uma técnica altamente sensível que amplifica e detecta pequenas quantidades de DNA. Sendo o FCoV um vírus RNA, antes da reacção propriamente dita, a enzima transcriptase reversa tem que gerar uma cópia DNA a partir do genoma viral (Addie & Jarret, 2006).

A RT-PCR permite detectar a infecção e não apenas documentar a exposição ao vírus como os testes serológicos (Hartmann, *et al.*, 2003).

7.7.1. RT-PCR no sangue

Esta técnica permite revelar a presença do FCoV, através da detecção do seu RNA, na amostra biológica (Hartmann, 2005). Tal como nos testes serológicos, os resultados do RT-PCR devem ser interpretados contextualizando com a história clínica, quadro sintomatológico e outras alterações (Simons, Vennema, Rofina, Pol, Horzinek, Rottier & Egberink, *et al.*, 2005; Sharif *et al.*, 2010), pois o facto de se detectar virémia não indica invariavelmente a doença e animais com outras afecções (stress imunitário) podem mostrar-se positivos (Hartmann, *et al.*, 2003).

Segundo a revisão de Sharif *et al.* (2010), os *primers* habitualmente usados têm como alvo as regiões mais conservadas do genoma viral como o gene *Pol*, 7b e a região 3'UTR, o que permite detectar a maioria, se não a totalidade, das estirpes do FCoV (Sharif *et al.*, 2010). Como a sequência do gene S difere entre o FCoV tipo I e tipo II, os *primers* da reacção podem ser desenhados de modo a permitir a sua diferenciação, numa reacção de RT-PCR seguida de *nested PCR* (nPCR) (Sharif *et al.*, 2010).

O facto de não se conhecer um determinante genético específico que distinga os biótopos e o polimorfismo das mutações impossibilita a criação de *primers* capazes de diferenciar infecções por FECV de FIPV (Norris, 2007; Addie *et al.*, 2009; Sharif *et al.*, 2010).

Simmons *et al.* (2005) desenharam um RT-PCR cujos *primers* tinham como alvo o gene M e a sequência líder, de modo a detectar a replicação do vírus nos monócitos e macrófagos, essencial ao desenvolvimento da doença. Este teste demonstrou ter sensibilidade e especificidade elevadas. No entanto, noutro estudo (Can-Sahana *et al.*, 2007) o mesmo teste não

demonstrou tão bons resultados, uma vez que o FCoV foi detectado também no sangue de animais saudáveis.

A sensibilidade e especificidade do RT-PCR podem ser aumentadas recorrendo-se à técnica de *real time* (Sharif *et al.*, 2010). Ao permitir a quantificação do mRNA viral, e assim o nível de replicação do vírus, esta técnica ajuda a diferenciar portadores são de gatos doentes, além de conseguir eliminar o problema da contaminação com outros produtos de PCR do laboratório (Pedersen, 2009).

Resultados falsos-negativos podem ser causados por degradação do RNA, falha na transcrição reversa ou variação da sequência de nucleótidos viral (Hartmann, *et al.*, 2003; Sharif *et al.*, 2010). Por outro lado, a infecção com CCV e TGEV pode contribuir para a obtenção de resultados falso-positivos (Hartmann, *et al.*; 2003; Addie *et al.*, 2003).

7.7.2. RT-PCR nas fezes

O RT-PCR, além de se aplicar ao sangue, pode também ser utilizado na detecção de vírus nas fezes, onde é o método ideal para identificar excreção fecal do vírus (Hartmann, 2005; Kennedy, 2009). A força do sinal da reacção é equivalente à quantidade de vírus presente nos intestinos (Hartmann, 2005; Sharif *et al.*, 2010).

A recolha de fezes deve ser criteriosa, uma vez que os animais podem excretar o vírus de forma intermitente (Kennedy, 2009). Há quem sugira que a recolha e análise sejam feitas durante 4 a 5 dias seguidos (Hartmann, 2005), ou que se colham pelo menos duas amostras com um mês de intervalo, ou de três dias seguidos, repetindo-se a colheita um mês depois (Kennedy, 2009). Gatos excretadores crónicos podem ser identificados por nove resultados positivos consecutivos recolhidos com intervalos de um mês (Addie & Jarret, 2006).

As amostras têm que ser tratadas com cuidado, congeladas, protegidas das enzimas RNA-ases ambientais e processadas quanto antes (Hartmann, 2005; Sharif *et al.*, 2010).

A detecção do vírus é útil para confirmar a presença do FCoV em gatos seronegativos mas suspeitos de PIF, e para detectar a excreção do vírus (Addie *et al.*, 2009).

7.7.3. Outras aplicações da RT-PCR

De acordo com Kennedy *et al.* (1998), a realização de RT-PCR é um teste diagnóstico *ante-mortem* com a precisão da análise histopatológica, mas sem os riscos da biópsia. No estudo de Hartmann, *et al.* (2003) o RT-PCR feito ao líquido de derrame detectou correctamente todos os casos de PIF e excluiu o controlo. A aplicação do *real-time* RT-PCR no líquido de derrame costuma revelar cargas virais elevadas e ser um bom auxiliar no diagnóstico de PIF (Pedersen, 2009).

O FCoV pode ser detectado em vários tecidos, sendo o fígado e o baço órgãos mais sensíveis à detecção do vírus que os rins (Herrewegh, *et al.*, 1998; Sharif *et al.*, 2010).

Fazer RT-PCR ao LCR também já foi proposto mas ainda não há dados acerca dessa abordagem (Addie *et al.*, 2009). No entanto, sabe-se que o vírus pode estar presente no LCR em gatos saudáveis com a barreira hemato-encefálica comprometida (Hartmann, 2005).

7.8. Detecção de Antígeno nos Tecidos

A detecção do antígeno viral nos tecidos faz-se por imunohistoquímica e imunofluorescência directa, com vista a obter um diagnóstico definitivo de PIF (Addie & Jarret, 2006; Addie *et al.*, 2009). Neste momento, a análise imunohistoquímica associada à histopatologia constitui o *gold standard* do diagnóstico de PIF (Hartmann, *et al.*, 2005; Paltrinieri *et al.*, 2007; Pedersen, 2009).

A confirmação da presença do vírus nos tecidos também pode ser feita por detecção do ácido nucleico através da técnica de hibridação *in situ* (Kennedy, 2009) e por microscopia electrónica (Kipar *et al.*, 2005).

Na presença de derrame, a técnica faz-se nos esfregaços do mesmo, caso contrário, tem que se obter amostras de tecido dos órgãos afectados para realizar a análise histológica, seguida de detecção por imunohistoquímica ou imunofluorescência do FCoV nos macrófagos intra-lesionais (Hartmann, *et al.*, 2003).

A obtenção de amostras por biópsia *in vivo* está limitada pelo risco anestésico associado à cirurgia e à proporção relativamente alta de resultados falsos-negativos das técnicas *True-cut* e PAAF (Paltrinieri *et al.*, 2007a). O valor diagnóstico da PAAF eco-guiada *in vivo*, está sob investigação (Paltrinieri *et al.*, 2007a; Addie *et al.*, 2009). A recolha de amostras hepáticas tem maior sensibilidade em comparação com amostras renais (Paltrinieri *et al.*, 2007a).

Por estas razões o diagnóstico definitivo nem sempre é possível, especialmente na forma seca em que não se consiga obter líquido de derrame (Addie *et al.*, 2009).

7.8.1. Imunohistoquímica e Imunofluorescência Directa

A imunohistoquímica permite identificar a presença de antígeno FCoV em células ou preparações de tecidos, com base no princípio da especificidade de ligação dos anticorpos com os seus antígenos específicos. Se os anticorpos utilizados na reacção estiverem marcados com um fluorocromo, trata-se de uma reacção de imunofluorescência (IHCWorld, 2010).

A imunofluorescência recorre a anticorpos monoclonais ou policlonais altamente específicos para o FCoV que se ligam ao vírus se este estiver presente nas amostras, as quais podem ser esfregaços de líquido de derrame, cortes de tecidos fixados em formalina, tecidos embebidos em parafina e até zaragatoas da membrana nictitante, embora este último caso ainda necessite de confirmação (Addie & Jarret, 2006; Norris, 2007).

A detecção do antígeno viral nos derrames é muito específica, mas menos sensível que a detecção do vírus nas lesões parenquimatosas características da PIF (Pedersen, 2009).

A coloração imunofluorescente positiva do antígeno FCoV intracelular de macrófagos no derrame demonstra ter um VPP de 100%. Infelizmente, o VPN não é muito elevado (57%), o que pode ser explicado pelo número baixo de macrófagos nos esfregaços (Hartmann, *et al.*, 2003; Addie *et al.*, 2009; Pedersen, 2009) e pela ligação competitiva dos anticorpos anti-FCoV presentes nos derrames (Hartmann, *et al.*, 2003).

A coloração imunofluorescente não consegue diferenciar o FECV do FIPV, mas como este último se replica mais activamente surge em maiores concentrações, o que acaba por permitir a diferenciação (Hartmann, 2005).

De uma forma geral, a forma seca apresenta concentrações de antígeno viral menores que a forma húmida (Pedersen, 2009; Sharif *et al.*, 2010). Uma possível razão para esta diferença é o facto de as lesões com necrose (mais frequente nos piogranulomas da forma húmida) conterem mais vírus que as sem necrose (granulomas da forma seca) (Pedersen, 2009).

7.9. Características Anatomo- e Histopatológicas

7.9.1. Forma exsudativa

A característica mais evidente da PIF na forma húmida é a presença de líquido livre nas cavidades abdominal e/ou torácica, evidente logo à abertura das mesmas (C. Peleteiro, comunicação pessoal, Setembro 24, 2010) (Figura 14).

Figura 14: Derrame abdominal e deposição de fibrina nas serosas em gato com PIF exsudativa. Fotografia: Ana Mota.

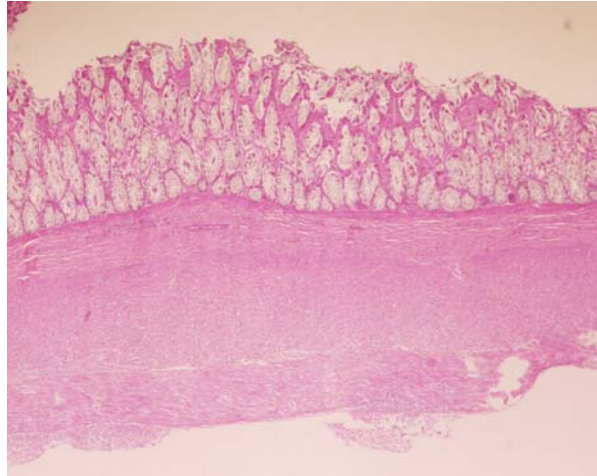


As superfícies serosas das cavidades abdominal e/ou torácica podem apresentar-se cobertas de fibrina, o que lhes confere um aspecto granular e com pequenas adesões (Maxie, 2007). Nas mesmas superfícies podem observar-se focos de necrose brancos ou infiltrações celulares em forma de placa ou nódulo saliente, os quais variam de poucos milímetros a vários centímetros de tamanho (Maxie, 2007; Pedersen, 2009; Sharif *et al.*, 2010).

Na cavidade abdominal, o omento pode estar espessado e retraído formando uma massa compacta no abdómen cranial, aderente entre si e/ou aos outros órgãos abdominais (Maxie,

2007; Pedersen, 2009). O mesentério pode estar espessado e opaco (Maxie, 2007) (Figura 15).

Figura 15: Corte da parede intestinal com evidência de colite e peritonite em gato com a forma exsudativa da PIF (x40; H&E). Imagem reproduzida com a permissão dos responsáveis pelo Laboratório de Anatomia Patológica – FMV.



Os rins podem surgir aumentados e apresentar uma superfície nodular, com número variável de nódulos firmes, brancos, pequenos ou grandes, fazendo protusão a partir do córtex (Maxie, 2007). Hepatite e pancreatite de gravidade variável podem estar presentes, caracterizando-se pela presença de pequenos focos brancos de inflamação. A túnica vaginal também pode estar afectada, resultando em periorquite em machos inteiros (Maxie, 2007).

A deposição de fibrina é menos evidente no tórax, embora seja comum a presença de focos inflamatórios brancos e firmes sob a pleura e os pulmões possam estar escurecidos e com textura semelhante a borracha (Maxie, 2007; Pedersen, 2009).

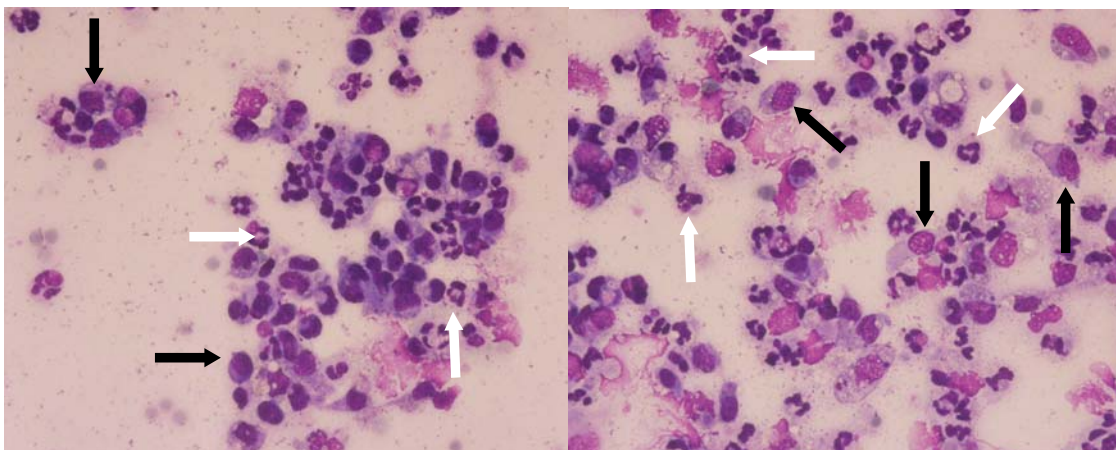
Os linfonodos abdominais e torácicos podem estar aumentados e apresentar uma superfície de corte com padrão lobulado (Maxie, 2007).

Derrame pericárdico e epicardite são menos frequentes (Maxie, 2007).

A principal lesão microscópica da PIF na sua forma exsudativa é o piogranuloma, que constitui uma forma particular de vasculite/flebite (Kipar *et al.*, 2005; Pedersen, 2009).

Os piogranulomas são constituídos por um agregado central de macrófagos rodeado por um exsudado inflamatório contendo principalmente neutrófilos e macrófagos e uma pequena quantidade de plasmócitos e linfócitos T, adjacente a pequenas veias (Kennedy, 2009; Pedersen, 2009; Sharif *et al.*, 2010) (Figura 16). Os macrófagos presentes no piogranuloma contêm elevadas concentrações de antígeno viral (Pedersen, 2009). Apesar de este processo ser orientado para a superfície, podem ser observadas lesões focais de flebite e infiltrados inflamatórios mistos mais profundamente no parênquima do órgão (Pedersen, 2009).

Figura 16: Citologia obtida PAFF renal em que observa quantidade abundante de polimorfonucleados neutrófilos (setas brancas) e macrófagos (setas pretas) (x400; Giemsa). Imagens reproduzidas com a permissão dos responsáveis pelo Laboratório de Anatomia Patológica – FMV.



As lesões piogranulomatosas tendem a seguir o percurso da artéria mesentérica cranial pelo que são particularmente prevalentes no abdómen, envolvendo principalmente veias de pequeno e médio calibre (Kennedy, 2009; Pedersen, 2009; Norris, 2007).

7.9.2. Forma não-exsudativa

Em gatos com a forma não exsudativa da PIF podem ser observados focos inflamatórios, como os já descritos, nas cavidades torácica e abdominal e/ou exclusivamente nos olhos e SNC (Maxie, 2007; Pedersen, 2009).

Na forma seca, as lesões assemelham-se mais a granulomas clássicos, embora sejam referidos também como piogranulomas (Pedersen, 2009). Os granulomas, especialmente os abdominais, podem variar entre o tamanho microscópico até aos vários centímetros de diâmetro, perceptíveis à palpação abdominal (Pedersen, 2009). Tal como os piogranulomas da forma húmida, também os granulomas da forma seca são mais frequentes na cavidade abdominal, nomeadamente rins, linfonodos mesentéricos, fígado, ceco/cólon, que na torácica (Pedersen, 2009).

Estas lesões constituem-se por acumulações de macrófagos e neutrófilos em redor dos vasos afectados, remissivos de lesões da forma exsudativa, circundados por infiltrados densos de linfócitos, em particular tipo B, e plasmócitos (Maxie, 2007; Pedersen, 2009). O endotélio apresenta-se edemaciado com ou sem necrose medial e com estreitamento do lúmen do vaso, o que pode levar a trombose (Maxie, 2007). O edema, a hiperémia, necrose, deposição de fibrina e a exsudação proteica não são tão pronunciados como nos piogranulomas da forma exsudativa (Kipar, *et al.*, 2005; Maxie, 2007).

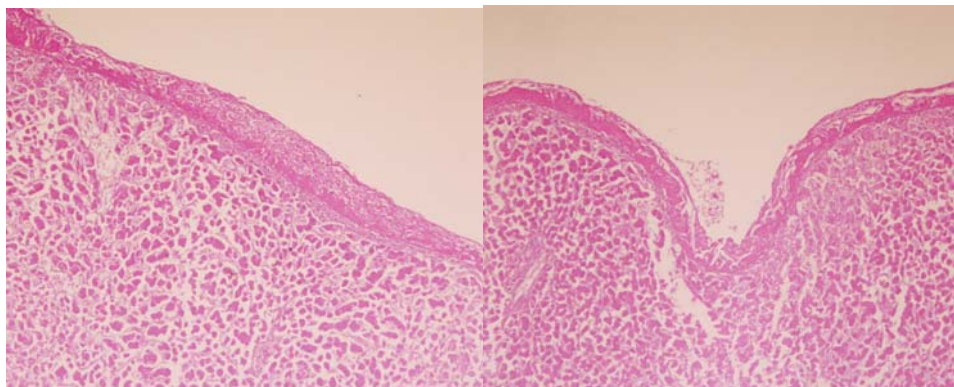
A lesão vascular resulta em nódulos visíveis na superfície e também no interior dos órgãos. Além disso, podem ser também observados pequenos focos de necrose espalhados pelo

parênquima hepático, resultantes de tromboflebite e enfarte da microvasculatura hepática. (Maxie, 2007)

As alterações microscópicas do omento, mesentério e outras serosas variam na gravidade. Alterações ligeiras correspondem a proliferação de células mesoteliais, exsudado fibrinoso ligeiro, com proliferação de fibroblastos, e neutrófilos e células mononucleares disseminados (Maxie, 2007). Alterações mais graves resultam da formação de uma espessa camada de fibrina aderente à serosa, com necrose e/ou hipertrofia do mesotélio. Grande número de neutrófilos, células mononucleares e *debris* necrótico podem estar envolvidos por fibrina. A inflamação pode estender-se da serosa ao intestino, afectando a camada muscular, linfonodos mioentéricos, submucosa e mucosa, a qual pode mostrar sinais de enfarte (Maxie, 2007).

Por todo o corpo observam-se lesões vasculares na cápsula e estroma dos órgãos (Maxie, 2007). Infiltrados subcapsulares ocorrem principalmente no fígado (Figura 17), pâncreas e pulmões, sendo que a perivasculite pode desenvolver-se no parênquima, especialmente nos rins (Maxie, 2007).

Figura 17: Deposição de fibrina sob a cápsula de Glisson (peritoneu visceral) (x100; H&E). Imagem reproduzida com a permissão dos responsáveis pelo Laboratório de Anatomia Patológica – FMV.



A nível pulmonar podem existir infiltrados como os acima descritos, lesões focais, mas também uma pneumonia intersticial difusa, geralmente mais grave quanto maior a proximidade à pleura visceral. À semelhança do anterior, pode desenvolver-se nefrite intersticial linfoplasmocítica generalizada ou focal (Maxie, 2007).

O baço pode apresentar-se aumentado devido a infiltração histiocitária e plasmocítica da polpa vermelha, hiperplasia da polpa branca, esplenite necrosante com deposição de fibrina e infiltrados polimorfonucleares (mais comuns na forma húmida) ou piogranulomas organizados (mais frequente na forma seca) (Kipar *et al.*, 2001; Maxie, 2007, Pedersen, 2009).

A linfadenomegália está habitualmente restrita aos linfonodos regionais do tórax e da cavidade abdominal com lesões similares às descritas para o baço, sendo evidente histiocitose,

e depleção (por apoptose dos linfócitos) ou hiperplasia dos folículos linfóides (Maxie, 2007; Pedersen, 2009).

Segundo Kipar *et al.* (2001), nos gatos afectados pela doença, o mediastino cranial (incluindo a zona do timo) e o parênquima dos linfonodos mesentéricos estão frequentemente afectados por processos granulomatosos necrosantes. Em geral, o tecido linfóide demonstra depleção dos linfócitos T, incluindo involução e mesmo atrofia do timo.

As lesões no SNC centram-se nas meninges e epêndima, estendendo-se também para o tecido nervoso subjacente, cérebro, medula espinal ou nervos periféricos (Kent, 2009; Pedersen, 2009). O mais frequentemente observado a olho nu são alterações nas leptomeninges (pia-máter + aracnóide): espessamento e bandas brancas (Maxie, 2007) ou apenas hiperémia da superfície (Addie & Jarret, 2006). Ocasionalmente hidrocefalia ou siringomielia podem resultar de ependimite (Maxie, 2007).

Histologicamente, observam-se os infiltrados perivasculares piogranulomatosos típicos com macrófagos, neutrófilos, linfócitos e plasmócitos nas meninges cerebrais e da medula espinal, plexo coróide, epêndima e espaços perivasculares (Maxie, 2007; Timmann *et al.*, 2008; Kent, 2009). Pode também estar presente arterite, flebite, edema secundário à exsudação e hemorragia (Timmann *et al.*, 2008) e o epêndima pode estar visivelmente endurecido e com sincícios reactivos no epitélio de revestimento (Maxie, 2007).

A lesão ocular mais característica na PIF é a infiltração linfocítica e plasmocítica da úvea anterior, a qual pode ser nodular ou difusa (Pedersen, 2009), e manifesta-se por edema e alteração da coloração da íris, por vezes com focos granulomatosos (Pedersen, 2009). A uveíte difusa, ou coriorretinite, pode progredir para panoftalmite (Maxie, 2007). São comuns os precipitados queráticos na córnea; estes compõem-se principalmente de macrófagos, outras células inflamatórias e fibrina (Colitz, 2005; Maxie, 2007; Pedersen, 2009).

A conjugação da presença de lesões fibrosas e granulomatosas nas superfícies serosas com derrames ricos em proteína nas cavidades orgânicas, vasculite/perivasculite granulomatosa e/ou lesões piogranulomatosas com distribuições variáveis em vários órgãos são consideradas diagnóstico de PIF (Addie & Jarret, 2006; Norris, 2007).

8. Tratamento

Actualmente, não existe nenhum regime terapêutico capaz de controlar a doença, assim sendo, todos os animais acabam inevitavelmente por morrer numa questão de dias, semanas ou meses (Hartmann & Ritz, 2008; Pedersen, 2009).

Desde que o animal tenha uma boa qualidade de vida e continue a comer sem perder peso, deve ser tratado, alimentado com dieta de elevada qualidade e mantido num ambiente o mais calmo possível (Addie, Paltrinieri & Pedersen 2004). A partir do momento em que o gato começa a perder condição corporal, a apresentar sintomas debilitantes, a diminuir a

qualidade de vida, o tratamento está desaconselhado e a eutanásia torna-se indicada devido às fracas perspectivas de sobrevivência (Addie, *et al.*, 2004).

Além da terapia específica para a PIF, os gatos afectados pela doença devem ser tratados com antibióticos de largo espectro e terapêutica de suporte, nomeadamente com fluidoterapia, fármacos diuréticos e oxigenoterapia (no caso dos derrames torácicos) (Ishida, Shibana, Tanaka, Uchida & Mochizuki, 2004; Hartmann, 2005). Gatos com derrame beneficiam de drenagem e injeção local com dexametasona (1mg/kg) nas cavidades abdominal ou torácica, a cada 24h até que não haja mais produção de líquido (Hartmann, 2005).

Se o animal apresentar uveíte, os sinais clínicos podem ser aliviados através da administração de suspensões oftálmicas tópicas de anti-inflamatórios glucocorticóides (acetato de prednisolona ou dexametasona) ou não esteróides (flurbiprofeno, suprofenos ou diclofenac), ou em casos refractários pela administração subconjuntival de acetato de triancinolona, um anti-inflamatório glucocorticóide de longa acção. Para alívio do espasmo ciliar e da dor, para manter a pupila dilatada e para prevenir sinéquias posteriores deve-se utilizar fármacos parassimpaticolíticos ciclopégicos como a tropicamida (Colitz, 2005).

8.1. Fármacos anti-virais

A administração de um fármaco com actividade anti-viral deve ser feita de forma a evitar a virémia secundária que despoleta a progressão final da doença (Li-En, Chao-Nan, Bi-Ling, Tong-Rong, Chi-Min, Ching-Ho, *et al.*, 2010). Iniciar o tratamento anti-viral quando os sintomas da doença estão já presentes é geralmente demasiado tarde (Hartmann & Ritz, 2008). Não há nenhum fármaco anti-viral específico para o FCoV. Fármacos que conseguem controlar a replicação do FCoV *in vitro*, costumam ser tóxicos *in vivo* (Addie & Jarret, 2006). Este é o caso da Ribavirina, um análogo nucleosídeo que previne o processamento do mRNA, impedindo a formação de partículas virais (Hartmann & Ritz, 2008). Apesar de fortemente inibidora do FIPV *in vitro*, é ineficaz *in vivo* (Pedersen, 2009), além de ser extremamente tóxica para os gatos em doses eficazes (ex.: hemólise, toxicidade medular e hepática) (Hartmann, 2005).

Lin-En *et al.* (2010) estudaram recentemente a eficácia de vários compostos anti-virais em células infectadas com uma estirpe de FIPV, tendo descoberto que a associação entre a aglutinina do *Galanthus nivalis* ("Campaínha-de-inverno") e o Nelfinavir (um inibidor de protease do vírus da Imunodeficiência Humana 1) tem actividade anti-viral contra o FCoV: a aglutinina liga-se às glicoproteínas S e M do envelope viral impedindo a entrada do vírus e o nelfinavir inibe a replicação viral no interior da célula.

Embora ainda não haja estudos *in vivo*, esta associação representa uma potencial opção terapêutica na prevenção e tratamento da PIF, desde que o diagnóstico seja feito atempadamente (Li-En *et al.*, 2010).

8.2. Tratamento imunossupressor

Fármacos imunossupressores como os glucocorticóides e a ciclofosfamida têm sido usados na PIF, embora apenas prolonguem o tempo de vida sem alterar o seu desfecho (Pedersen, 2009).

A prednisolona é o principal agente imunossupressor usado: é seguro, melhora o bem-estar do animal, estimula o seu apetite e suprime tanto a resposta imunitária humoral como a celular (Addie & Jarret, 2006). A dose recomendada é de 2 a 4 mg/kg SID por via oral (PO) com redução gradual da mesma a cada 10-14 dias, até determinação da dose óptima mínima através da avaliação da resposta ao tratamento (Hartmann, 2005; Addie & Jarret, 2006). Alternativamente, pode usar-se Ciclofosfamida 2-3mg/kg PO 4 vezes por semana, todas as semanas, ou ainda associar os dois fármacos (Hartmann, 2005; Norris, 2007).

8.3. Interferão α Recombinante Humano

É uma citocina com actividades imunomoduladora e anti-viral directa, não é viricida mas inibe a síntese de ácido nucleico e proteínas virais (Hartmann, 2005). Demonstrou a sua eficácia contra o FCoV *in vitro* isoladamente e em conjunto com a ribavirina (Hartmann, 2005).

Existem dois protocolos para a sua utilização: a injeção parenteral (intramuscular ou subcutânea) de doses altas de 10^4 a 10^6 UI/dia e a administração oral de doses mais baixas de 1-50 UI/dia PO durante 7 dias consecutivos em semanas alternadas (Hartmann, 2005; Addie & Jarret, 2006). O primeiro protocolo é mais adequado para o tratamento da forma húmida e o segundo para o tratamento da forma seca (Hartmann, 2005; Addie & Jarret, 2006).

O IFN- α pode ser administrado por via oral durante muito tempo pois não leva à criação de anticorpos. Por esta via não tem actividade anti-viral, ao ser inactivado no tracto gastrointestinal (Hartmann, 2005), mas uma vez na mucosa oral, estimula o tecido linfóide local, levando a uma libertação de citocinas pelas células linfáticas na orofaringe, o que despoleta uma cascata de respostas imunitárias que acaba por actuar sistemicamente (Hartmann, 2005).

Quando a administração é feita por via parenteral, os animais tornam-se refractários ao tratamento ao fim de 3 a 7 semanas, consoante a dose, devido à produção de anticorpos neutralizantes contra a molécula (Hartmann, 2005; Addie & Jarret, 2006).

8.4. Interferão ω felino

Por ser uma citocina homóloga tem maior actividade anti-viral nas células felinas e é menos antigénico que a molécula anterior (Hartmann, 2006; Addie & Jarret, 2006). *In vitro*, o FIPV é muito sensível a este IFN, que inibe a replicação viral (Hartmann, 2006).

No estudo de Ishida *et al.* (2004) associou-se IFN ω (1×10^6 UM/kg/dia SC dia sim, dia não), dexametasona (1mg/kg administrada por via intra-torácica ou intra-peritoneal) na presença de derrame, ou prednisolona 2mg/kg SID PO numa fase inicial, reduzindo-se depois o IFN ω (50.000 U/gato PO uma vez por semana) e a prednisolona (até aos 0,5mg/kg cada 48h) por um período variável até se observar a remissão dos sintomas. A partir deste estudo Ishida *et al.* (2004) declararam que a utilização do interferão ω felino pode levar à remissão de um terço dos gatos com PIF. No entanto, mais recentemente Hartmann & Ritz (2008) afirmaram que este tratamento é totalmente ineficaz.

8.5. Outros tratamentos

8.5.1. Inibidores da Tromboxano-sintetase

Hidroclorido de Ozagrel suprime a agregação plaquetária através da inibição da produção de Tromboxano A2 (Hartmann & Ritz, 2008). Foi utilizado com sucesso na dose de 5-10mg/kg BID em associação com prednisolona (2mg/kg/dia) mas apenas em 2 gatos com derrame abdominal (Addie & Jarret, 2006; Norris, 2007).

8.5.2. Pentoxifilina

É um inibidor do TNF- α utilizado com o objectivo de diminuir a vasculite que resulta da expressão dessa citocina (Norris, 2007). É administrado numa dose de 100mg/gato PO BID em associação com prednisolona (Norris, 2007) mas não tem sido provado o seu benefício (Pedersen, 2009).

8.5.3. Vitaminas e anti-oxidantes

A vitamina A é um importante anti-oxidante e pode ser dado na dose 200 UI/dia PO (directamente na boca ou na comida, sob a forma de óleo de peixe). Esta suplementação não deve ser prolongada além das 4-6 semanas devido ao risco de deposição no osso juntos às articulações (Addie & Jarret, 2006).

A vitamina B1 (tiamina) tem sido utilizada numa dosagem de 100 μ g/dia PO (na boca ou na comida), sendo um bom estimulante do apetite (Addie & Jarret, 2006).

A vitamina C (ácido ascórbico) é um anti-oxidante, pode ser dado na dose de 125mg BID PO (na boca ou na comida), por períodos curtos pelo risco de formação de cristais de oxalato de cálcio na urina (Addie & Jarret, 2006).

A vitamina E é também um anti-oxidante que pode ser administrado na dose de 25-75UI/gato BID PO (na boca ou na comida (Addie & Jarret, 2006).

Esteróides anabolizantes podem ser utilizados para estimular o apetite e diminuir o catabolismo (Addie & Jarret, 2006).

Na revisão de Pedersen (2009) não se considera existir mais-valia na inclusão de vitaminas, nutracêuticos ou imunoestimulantes no tratamento da doença.

8.6. Novas Prespectivas de Tratamento

8.6.1. Poliprenil Imunostimulante

Este fármaco foi recentemente testado em três gatos com a forma seca da doença, nos quais demonstrou aliviar os sintomas e prolongar a sobrevivência (Legendre & Bartges, 2009). Pensa-se que o seu mecanismo de acção consista em aumentar a expressão dos mRNA dos linfócitos T *Helper*, responsáveis pela eficácia da resposta celular. Apesar das boas indicações ainda são necessários mais estudos para esta molécula estar disponível comercialmente (Legendre & Bartges, 2009; Kennedy, 2009).

8.6.2. Compostos de Piridinil Imidazole

Estes fármacos são inibidores da p38MAPK responsável pela activação de citocinas pró-inflamatórias, nomeadamente a TNF- α , que contribuem para a progressão fatal da doença (Regan *et al.*, 2008). Em Medicina Humana são utilizados no tratamento de doenças inflamatórias crónicas como a artrite reumatóide; em Medicina Veterinária já foram feitos ensaios com resultados bastante satisfatórios, o que abre portas à sua utilização nesta área (Regan *et al.*, 2008).

8.6.3. Inibidores das Catepsinas

A utilização destas moléculas está a ser ensaiada em Medicina Humana, numa série de doenças como o cancro, osteoartrite e doenças auto-imunes, embora também se tenham mostrado promissoras na coibição da entrada dos vírus nas células-alvo (Regan *et al.*, 2008).

Para Regan, *et al.* (2008) a importância da catepsina B na entrada do FCoV serótipo II nas células cria a possibilidade da utilização destes inibidores no tratamento da PIF.

8.7. Monitorização do Tratamento e Prognóstico

Seja qual for o tratamento escolhido é importante monitorizar o progresso de cada animal (Addie & Jarret, 2006), sobretudo averiguar a febre para ajustar a terapêutica e reavaliar, inicialmente a cada 7-14 dias, depois uma vez por mês, HT, globulinas, ratio A:G, AGP e peso. A diminuição dos níveis de globulinas e AGP, aumento do ratio A:G e do HT, aparecimento de reticulócitos nos esfregaços sanguíneos e aumento do peso são indicadores promissores. Por outro lado a manutenção de níveis elevados ou aumento da AGP e globulinas, perda de peso, HT abaixo dos 20% sem se observar reticulócitos indicam a progressão

da PIF e deverá equacionar-se a eutanásia, se a qualidade de vida do animal estiver em causa (Addie & Jarret, 2006).

O prognóstico de gatos com PIF é muito reservado (Addie *et al.*, 2009). Gatos com a forma húmida da doença, geralmente só sobrevivem por alguns dias a poucas semanas. Indivíduos com a forma seca podem sobreviver várias semanas ou meses, embora quando aparecem sinais neurológicos, a morte surja rapidamente (Addie & Jarret, 2006).

9. Prevenção

9.1. Vacinação

Actualmente existe apenas uma vacina para a PIF, Primucell[®] da Pfizer[®], que não é comercializada em Portugal. Antes do desenvolvimento desta vacina, muitas tentativas foram feitas que falharam, principalmente devido ao ADEI (Pedersen, 2009).

A Primucell[®] incorpora um mutante de uma estirpe FIPV sensível à temperatura que apenas se consegue replicar a temperaturas baixas, como a do epitélio de revestimento do tracto respiratório superior (Addie & Jarret, 2006; Addie *et al.*, 2009).

Esta vacina é administrada por via intranasal produzindo uma resposta imunitária local (IgA) na porta de entrada do FCoV, a orofaringe, induzindo também uma resposta celular sistémica (Addie & Jarret, 2006 e Addie *et al.*, 2009; Pedersen, 2009). O vírus vacinal pode ser excretado por via oronasal até 4 dias após a vacinação e causa seroconversão ligeira (Addie & Jarret, 2006).

No entanto, existem preocupações quanto à segurança e à eficácia desta vacina. A questão da segurança prende-se principalmente com o facto de a vacina também poder causar ADEI, embora estudos de campo não tenham verificado esta situação (Addie & Jarret, 2006 e Addie *et al.*, 2009).

A vacina aparenta ser segura, em gatas gestantes, não afectando a sobrevivência dos gatinhos nem a capacidade reprodutiva das colónias, podendo até ser administrada simultaneamente com outras vacinas e em gatos FeLV-positivos (Addie & Jarret, 2006).

A eficácia da vacina tem sido questionada principalmente por ter origem no serótipo II do vírus quando o mais prevalente é o serótipo I (Addie & Jarret, 2006; Addie *et al.*, 2009; Pedersen, 2009). Além disso, os resultados dos estudos efectuados não são consistentes com taxas de eficácia a variar entre os 0% e os 75% (Addie & Jarret, 2006 e Addie *et al.*, 2009).

Esta vacina não é considerada nuclear (Addie *et al.*, 2009), sendo mesmo desaconselhada pelo *Vaccination Guidelines Group* da *World Small Animal Veterinary Association* (2010).

De qualquer forma se a sua utilização for considerada, deve-se fazer a primovacinação em gatinhos a partir das 16 semanas, administrando duas doses com três semanas de intervalo

(Addie & Jarret, 2006; Addie *et al.*, 2009). Já foi administrada com segurança em gatinhos com apenas 9 semanas (Addie & Jarret, 2006).

Embora haja poucos estudos relativos à duração da imunidade conferida, pensa-se que esta seja de curta duração, como está envolvida a imunidade das mucosas, pelo que as revacinações regulares são recomendadas (Addie *et al.*, 2009). A Pfizer® recomenda a revacinação anual.

Não está especificado, mas é aconselhável testar os animais antes de serem vacinados porque a vacina não é eficaz em animais que sejam seropositivos ou que estejam a incubar a doença (Addie & Jarret, 2006).

Depois da Primucell® já vários outros estudos foram feitos na tentativa de criar uma vacina realmente eficaz e viável, mas sem sucesso (Glansbeek, Haagmans, de Lintelo, Egberink, Duquesne & Aubert, *et al.*, 2002; Hohdatsu, Yamato, Ohkawa, Kaneko, Motokawa, Kusuha-
ra, *et al.*, 2003; Hebben, Duquesne, Cronier, Rossi & Aubert, 2004).

Hajjema *et al.* (2004) criaram uma vacina viva a partir de uma estirpe do FIPV com deleção dos genes 3abc e 7ab, cuja administração não causou sinais clínicos, mas induziu resposta imunitária (níveis altos de anticorpos neutralizantes). No entanto ainda são precisos estudos que comprovem a viabilidade desta vacina (Patel & Heldens, 2009).

Uma nova abordagem descrita por German, Helps & Harbour (2004) é a utilização de vírus espumosos (*foamy viruses*) como vectores vacinais com vista a potenciar uma resposta imunitária celular e proporcionar uma protecção permanente, mas ainda é preciso investigar mais esta hipótese.

9.2. Controlo da PIF em Gatis

A PIF é um problema de gatos de grupo, particularmente em gatis de criação e abrigos (Addie *et al.*, 2009). As mortes por PIF são proporcionais à sobrepopulação no local, ao número de animais jovens, ao tempo de permanência na instalação e à gravidade de doenças na infância (Pedersen, 2009).

A via de transmissão fecal-oral permite que o FCoV seja mantido no ambiente por ciclos contínuos de infecção e reinfeção, se não forem aplicadas medidas de higiene (Addie *et al.*, 2009).

Para minimizar a introdução e dispersão do FCoV nos gatis pode-se proceder às acções descritas na Tabela 3.

Tabela 3: Sugestões para o Controlo da PIF em Gatis. Adaptado de Addie, D. D., & Jarrett, O. (2006). Feline Coronavirus Infections. In *Infectious Diseases of the Dog and Cat, Revised Reprint* (3rd ed., pp. 88-103). St Louis, Missouri: Saunders.

Medida	Descrição
Reduzir a contaminação fecal do ambiente	<p>Ter um areão para cada 1-2 gatos.</p> <p>Limpar os areões pelo menos uma vez por dia.</p> <p>Manter os areões afastados das taças da comida.</p> <p>Aspirar com regularidade junto aos areões.</p> <p>Tosquiar a zona traseira de gatos com pêlo comprido.</p>
Número de gatos	<p>Não ter mais de 8 a 10 gatos.</p> <p>Manter os gatos em grupos estáveis de 3 a 4 animais.</p> <p>Em abrigos de resgate cada gato deve estar numa instalação isolada e não se misturar com outros animais.</p> <p>Manter os animais em pequenos grupos de acordo com o seu estado: seronegativos e não excretadores juntos e seropositivos e excretadores juntos.</p>
Testagem de vírus e anticorpos	<p>Testar gatos novos antes da sua introdução no gatil ou acasalamento.</p> <p>Permitir a entrada apenas a animais seronegativos e não excretadores em gatis livres de FCoV.</p>
Isolamento e desmame precoce	<p>Isolar a fêmea gestante 2 a 3 semanas antes do parto em instalações de quarentena.</p> <p>Disponibilizar equipamento próprio para esse isolamento (roupa dos funcionários, tigelas, areão, etc.).</p> <p>Criar e cumprir um plano de higiene e de desinfecção rigoroso para a unidade de isolamento.</p> <p>Testar a gata para anticorpos antes e depois do parto. Se seronegativa pode ficar com as crias, se seropositiva fazer o desmame às 5-6 semanas.</p> <p>Testar os gatinhos depois das 10 semanas de idade para verificar a eficácia do isolamento.</p>

CAPÍTULO II: TRABALHO EXPERIMENTAL PARA DETERMINAÇÃO DE RELAÇÃO ENTRE APRESENTAÇÃO CLÍNICA, CARGA VIRAL E TÍTULO DE ANTICORPOS NA PIF

1. Objectivos

1. Aferir da existência de uma relação entre a carga viral presente nas amostras biológicas e o título de anticorpos nos animais em que se detectou a presença de genoma viral;
2. Comparar os resultados obtidos com a apresentação clínica dos animais, dos quais foi possível registar esses dados ou recolhê-los retrospectivamente.
3. Genotificar o FCoV detectado nas amostras, de modo a calcular a proporção de cada serótipo do FCoV na amostra estudada e a investigar a sua influência no desenvolvimento de PIF.

2. Materiais e Métodos

2.1. População do estudo

Para a realização deste estudo foram utilizadas amostras provenientes de animais (n=45) nos quais se verificou a presença de ácido nucleico viral, com ou sem sintomas de PIF.

Parte das amostras foram recolhidas de gatos com suspeita de PIF que se apresentaram no Hospital Escolar da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa (FMV) entre Janeiro e Outubro de 2010. Destes gatos foram recolhidos e registados dados sobre a anamnese, quadro sintomatológico e, nos casos em que foi possível, de exames complementares de diagnóstico e de análises anatomopatológicas. Para tal foi concebida uma Ficha de Recolha de Dados (Anexo IV).

As restantes amostras pertenciam a gatos positivos a FCoV oriundos do Canil Municipal de Lisboa, cujas amostras biológicas tinham já sido utilizadas num rastreio virológico de carnívoros errantes (Rosado, 2009). A história pregressa e apresentação clínica destes animais eram desconhecidas, razão pela qual neste grupo só foi possível relacionar a carga viral e título de anticorpos.

As amostras biológicas foram divididas em três grupos diferentes:

Grupo I – animais com PIF, consultados no Hospital Escolar da FMV;

Grupo II – animais positivos a FCoV, mas com doenças concomitantes, seguidos no Hospital Escolar da FMV;

Grupo III – animais positivos a FCoV mas saudáveis, adiante designados *portadores* *sãos*, provenientes do Canil Municipal de Lisboa.

O diagnóstico de PIF no Grupo I foi obtido por análise anatomo-histopatológica ou por detecção viral no líquido de derrame (Hartmann *et al.*, 2003).

De todos os grupos foram determinados os valores de carga viral, enquanto apenas nalguns animais seleccionados do Grupo I e do Grupo III foi possível proceder à titulação dos anticorpos.

2.2. Recolha de Amostras

As amostras provenientes do Canil Municipal de Lisboa foram recolhidas após eutanásia dos animais com quetamina por via intramuscular, seguida da administração intracardíaca de 10ml de pentobarbital sódico (Eutasil®). A colheita de sangue foi feita por punção intracardíaca (agulhas 21-23G) para seringas de 5ml, antes da administração de pentobarbital sódico, e a zaragatoa rectal feita após a eutanásia.

As amostras biológicas, recolhidas no Hospital Escolar, foram realizadas em gatos suspeitos de PIF durante o acto da consulta. A colheita de sangue foi feita por venopunção das veias cefálica, femoral ou jugular para tubos de EDTA de 1ml. As amostras rectais foram colhidas por zaragatoa.

Sempre que possível, recolheu-se líquido de derrame torácico e/ou abdominal. A abdominocentese foi realizada através da punção da parede abdominal a aproximadamente 1 cm lateral à direita da linha média e 1-2 cm caudal à cicatriz umbilical (quadrante direito caudal) com o animal em decúbito lateral esquerdo. A punção fez-se com ou sem auxílio do ecógrafo, com agulhas de 23G ou de 25G, para seringas de 3ml.

A toraconcentese fez-se, com o animal em decúbito esternal ou lateral esquerdo, por punção do 7º ou 8º espaço intercostal com uma borboleta (20-22G) acoplada a um extensor, um sistema de três vias e uma seringa de 10ml.

O grau de prostração dos animais permitiu realizar os procedimentos referidos sem recorrer à sedação.

Todas as amostras foram levadas de imediato para o laboratório e mantidas refrigeradas a 4°C até ao seu processamento.

2.3. Processamento das amostras

As amostras de sangue foram centrifugadas a 5000 rpm durante 5 minutos (1956g) para separar o plasma das células sanguíneas e congeladas a -20 °C.

As amostras colhidas por zaragatoa rectal foram suspensas em solução tampão salino fosfatado (PBS) e centrifugadas a 10000 rpm durante 10 minutos (7826g).

2.4. Extracção de RNA

O RNA do FCoV foi extraído utilizando o *kit* QIAmp Viral RNA no casos das amostras colhidas por zaragatoa rectal e o *kit* Qiagen RNeasy para extracção a partir do sangue, de acordo com as instruções do fornecedor (Qiagen®).

2.5. Detecção do FCoV e Determinação das cargas virais

Para detecção do FCoV as amostras foram amplificadas por *Real Time* RT-PCR, utilizando os *primers* e a sonda (FAM 5'; TAMRA 3'), em uso no Laboratório de Virologia da FMV, com o sistema Taqman RT-to-CT 1 step Kit (Applied Biosystems, Portugal). O fragmento amplificado, de 80pb, foi detectado pela emissão de fluorescência do corante FAM devido à deslocação da sonda pela actividade de exonuclease 5'-3' da DNA polimerase. O ciclo de amplificação incluiu um passo de transcrição reversa a 48°C durante 15 minutos, seguido de um passo de desnaturação a 95°C durante 2 minutos e 40 ciclos a 95°C/15 segundos e 60°C/1 minuto.

Para determinação da carga viral, foram efectuadas diluições seriadas de base 10 de um plasmídeo recombinante com o fragmento de 172 pb, (Figura 18) que inclui a região amplificada. O valor Ct (*threshold cycle*) para cada amostra foi determinado como o número do ciclo no qual a fluorescência emitida ultrapassou o limite de detecção, aferido pelo aparelho. De forma a construir uma recta padrão (Figura 19), o Ct de cada diluição foi avaliado contra o nº de cópias alvo de cada uma das diluições, calculadas com a seguinte fórmula:

$$\frac{X \text{ g/}\mu\text{l RNA}}{\text{Dimensão do Plasmídeo pb} \times 660} \times 6,022 \times 10^{23} = Y \text{ moléculas/}\mu\text{l}$$

Esta recta de calibração foi posteriormente utilizada para determinação da carga viral de cada amostra, em função dos respectivos valores de Ct.

Figura 18: Curvas obtidas para as soluções diluídas do plasmídeo recombinante.

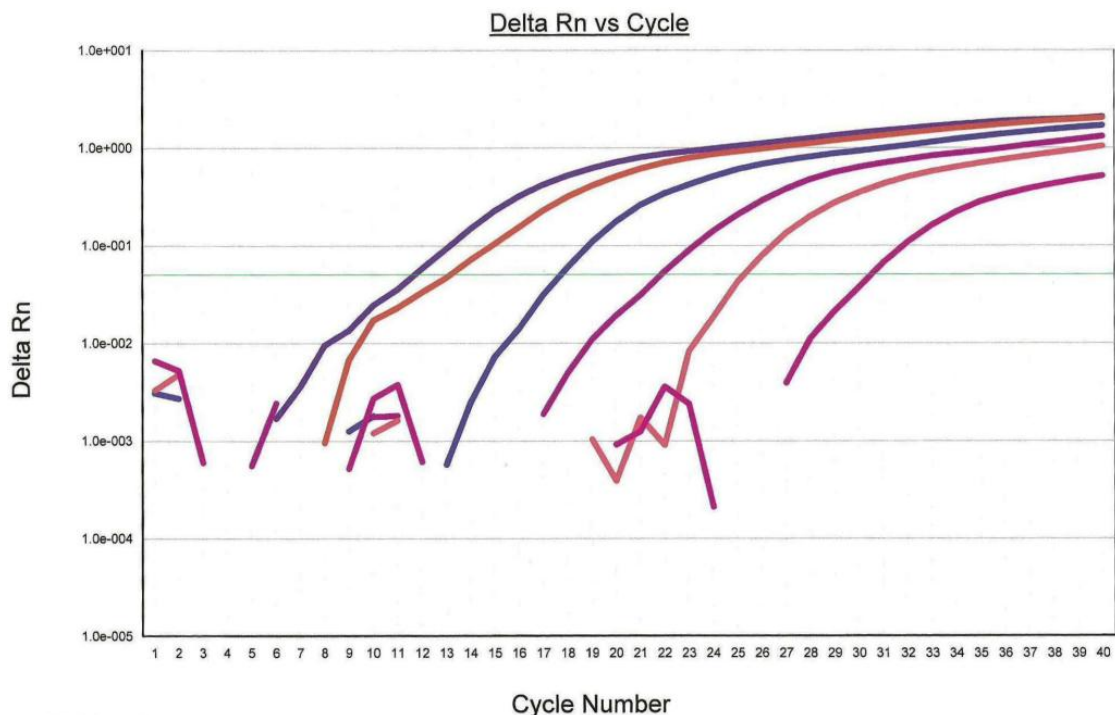
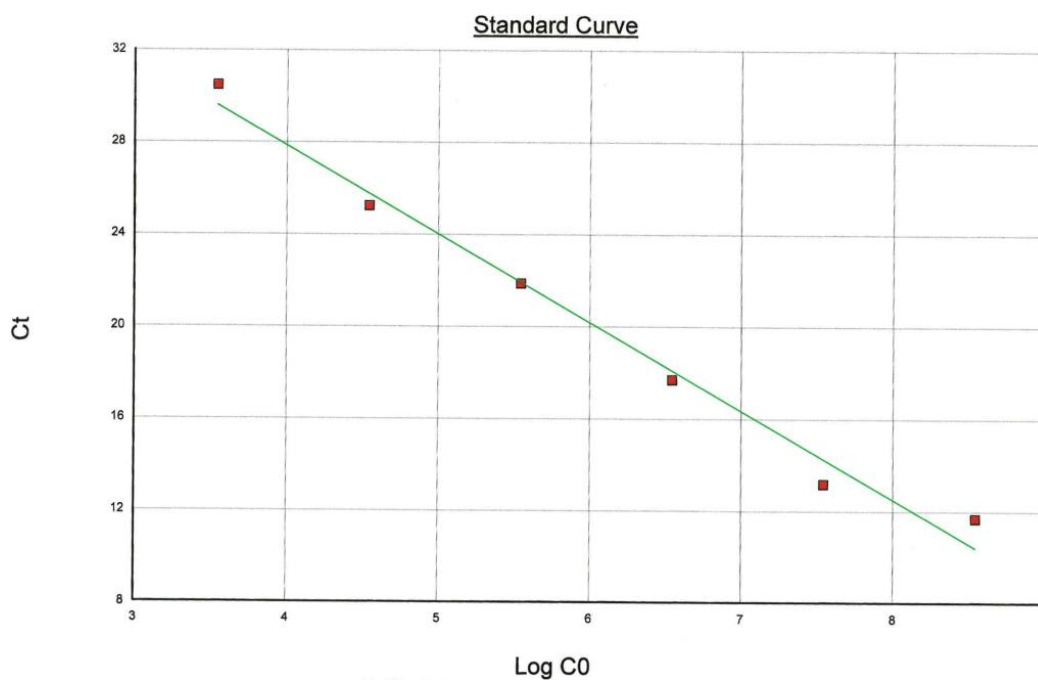


Figura 19: Recta Padrão.



O material genético das amostras e recombinante foi quantificado no espectrofotómetro *Nanodrop 2000c* (Thermo Scientific®).

2.6. Detecção e titulação de anticorpos

A detecção e a titulação dos anticorpos foram feitas recorrendo ao kit ELISA Indirecta Ingenzim Corona Felino (Ingenasa®), seguindo as instruções do fornecedor.

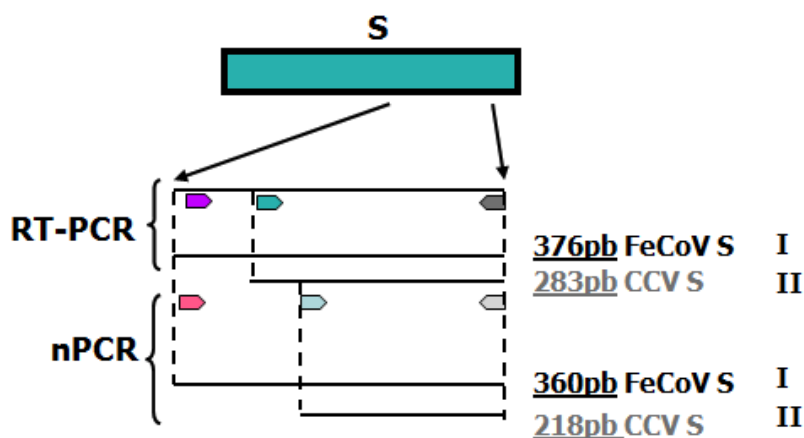
De acordo com este teste, 75% dos gatos com PIF tem títulos superiores a 1:6400 e 50% maiores que 1:12800. Por outro lado, só 20% dos gatos infectados pelo FECV possuem títulos na ordem dos 1:6400 e apenas 5% destes, acima de 1:12800.

2.7. Genotipificação do FCoV

Para este procedimento as amostras foram amplificadas por RT-PCR seguido de *nested* PCR (nPCR), de modo a obter fragmentos que permitam, pelo seu peso molecular, a distinção entre os dois subtipos do vírus (Addie *et al.*, 2003). Na primeira reacção amplificaram-se fragmentos 376-283 pb localizados na extremidade 3' do gene da proteína da espícula (S) e na segunda, fragmentos internos de 360-218pb.

A reacção de amplificação foi realizada com *one step* RT-PCR *Fidelity* Taq 2x Master Mix (GE Healthsciences®), 5 µL de amostra de RNA e com os *primers* *lffs*, *lcfs*, *lubs* num volume total de 25 µL. Depois procedeu-se ao nPCR com PCR *Fidelity* Taq 2x Master Mix (GE Healthsciences®), *primers* *nlffles*, *nlcfs*, *nlubs* (Addie *et al.*, 2003) e 1 µL de *template* proveniente da reacção anterior, com o mesmo volume final de reacção (Figura 20). Os fragmentos amplificados foram analisados por electroforese em gel de agarose a 2% com Gel Red™ a 05µl/10ml de Gel.

Figura 20: Esquema representativo das reacções RT-PCR e nPCR e tamanho dos respectivos produtos de amplificação. Imagem reproduzida com a permissão da Prof. Dra. Ana Duarte da FMV.



3. Resultados

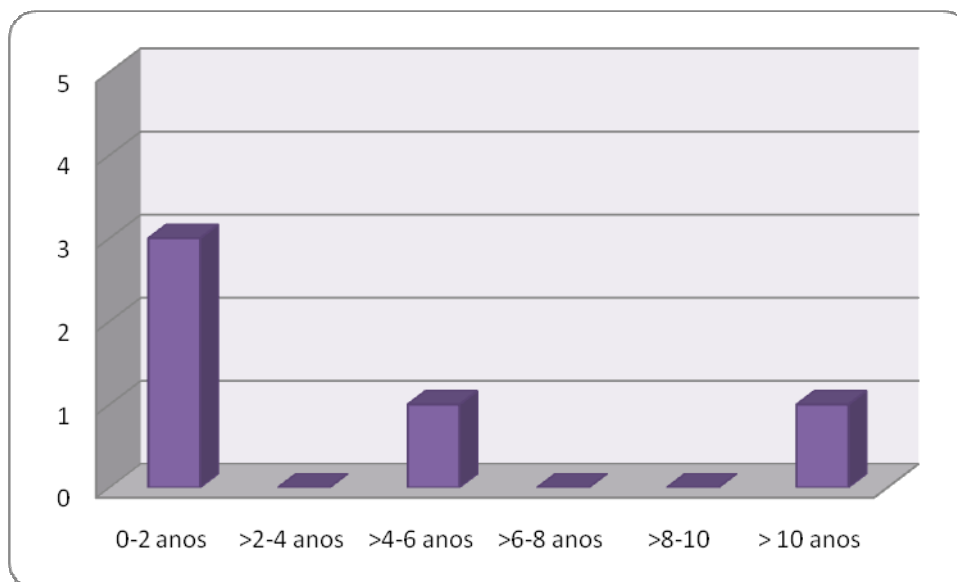
3.1. Apresentação Clínica (Grupo I)

Várias amostras provenientes de gatos suspeitos de PIF foram analisadas, mas nem em todos se confirmou a presença da doença. Apenas os animais em que a PIF foi confirmada (anatomopatologia e/ou detecção viral por *Real time* RT-PCR no líquido de derrame) foram considerados (n=5).

3.1.1. Caracterização da amostra

Dos 5 animais confirmados, 4 (80%) eram machos e apenas 1 era fêmea (20%). Destes 5, 60% tinha até 2 anos de idade, a faixa etária de maior risco na PIF (Bell *et al.*, 2006); os restantes escalões etários compreendiam 20% dos casos. Nenhum animal tinha entre 6 e 10 anos de idade (Gráfico 1).

Gráfico 1: Distribuição etária dos gatos afectados pela PIF.



Quanto à distribuição por raças verificou-se que 60% dos gatos eram de raça indeterminada (SRD). Um dos animais, o que corresponde a 20% da população, era da raça Siamês e outro era fruto de um cruzamento da raça anterior com Persa.

Na Tabela 4 encontra-se o resumo das características básicas dos 5 animais afectados.

Tabela 4: Características dos animais doentes.

Dados	Pantufa (43LVI/10)	Viti (68LVI/10)	Koska (87LVI/10)	Ozzy (112LVI/10)	Flor (117LVI/10)
Idade	5 Anos	12 Anos	15 Meses	5 Meses	12 Meses
Género	Macho	Macho	Macho	Macho	Fêmea
Raça	Persa x Siamês	Siamês	SRD	SRD	SRD

3.1.2. Sinais clínicos

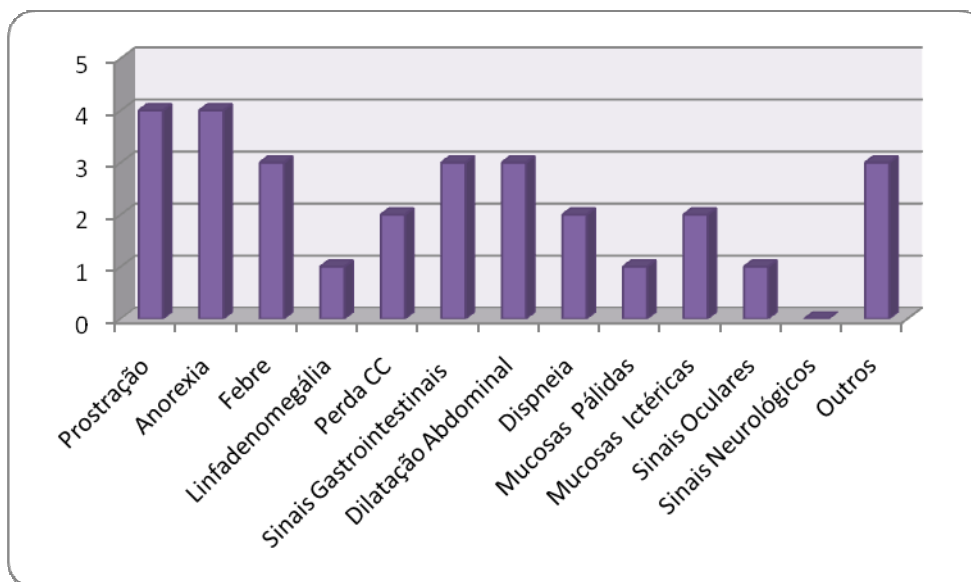
Como pode ser observado no Gráfico 2, os sinais clínicos mais frequentes foram prostração, anorexia e febre, com proporções de 80% para os dois primeiros sintomas de 60% para a febre.

40% dos gatos (2 em 5) apresentaram dispneia e 60% (3 em 5) dilatação abdominal. Estes sinais são indicadores consistentes da forma húmida da PIF. De facto, constatou-se que 4 gatos manifestaram a forma húmida e 1 gato, a forma seca.

Mais de metade dos animais apresentou sinais gastrointestinais (vômito e/ou diarreia). A perda de condição corporal e a coloração icterícia das mucosas foram reportadas em apenas 2 animais.

Linfadenomegália, mucosas pálidas, sinais oculares apenas foram observadas uma vez, não se tendo registado nenhum animal com sinais neurológicos.

Gráfico 2: Distribuição dos animais afectados por sinais clínicos.



Os outros sinais clínicos reportados foram a hipotermia, desenvolvida por um dos animais que inicialmente tinha manifestado febre, renomegália e atraso no crescimento, manifestações menos comuns desta doença, como se pode verificar na Tabela 5.

Tabela 5: Sinais clínicos apresentados por cada animal.

Sinais clínicos	43LVI/10	68LVI/10	87LVI/10	112LVI/10	117LVI/10
Prostração	X	X		X	X
Anorexia	X	X		X	X
Febre		X	X	X	
Linfadenomegália					X
Perda de CC			X		X
Sinais Gastrointestinais	X			X	X
Dilatação abdominal	X		X	X	
Dispneia		X	X		
Mucosas Pálidas				X	
Mucosas Ictéricas	X			X	
Sinais Oculares					X ¹

¹ (Alteração da cor da íris, precipitados queráticos, irite, uveíte posterior e congestão conjuntival marcada)

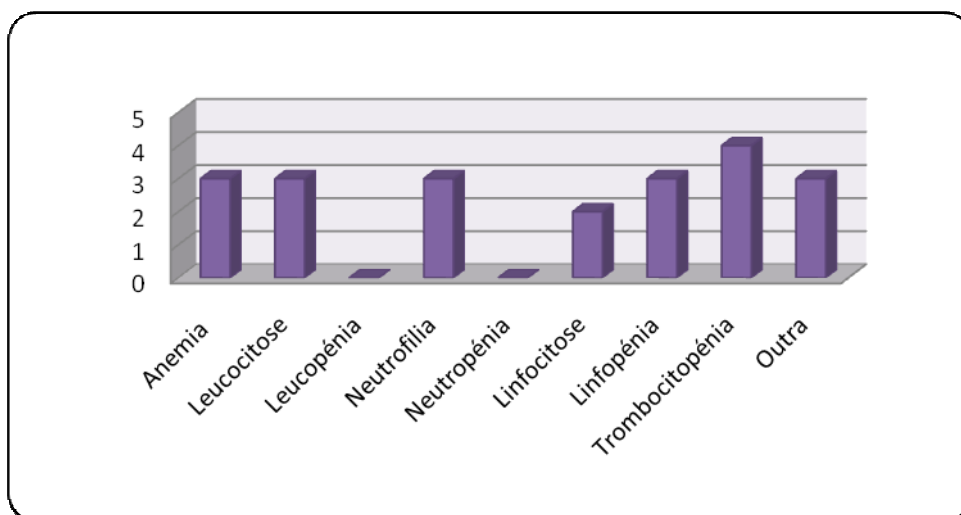
Tabela 5 (continuação): Sinais clínicos apresentados por cada animal.

Sinais Neurológicos					
Outros	x (úlceras orais, edema da face e dos membros ²)			x (Hipotermia)	x (Renomegália e atraso no crescimento)

3.1.3. Alterações do Hemograma

A alteração mais frequente foi trombocitopenia em 4 dos 5 gatos afectados. Seguiram-se a anemia, leucocitose, neutrofilia e linfopenia (60%). Dois gatos (40%) apresentaram linfocitose. Nenhum dos animais manifestou leucopenia ou neutropenia (Gráfico 3).

Gráfico 3: Distribuição das alterações do hemograma.



A alteração mencionada como “outra” foi monocitose em 3 casos (Tabela 6).

Tabela 6: Alterações do hemograma apresentadas por cada gato.

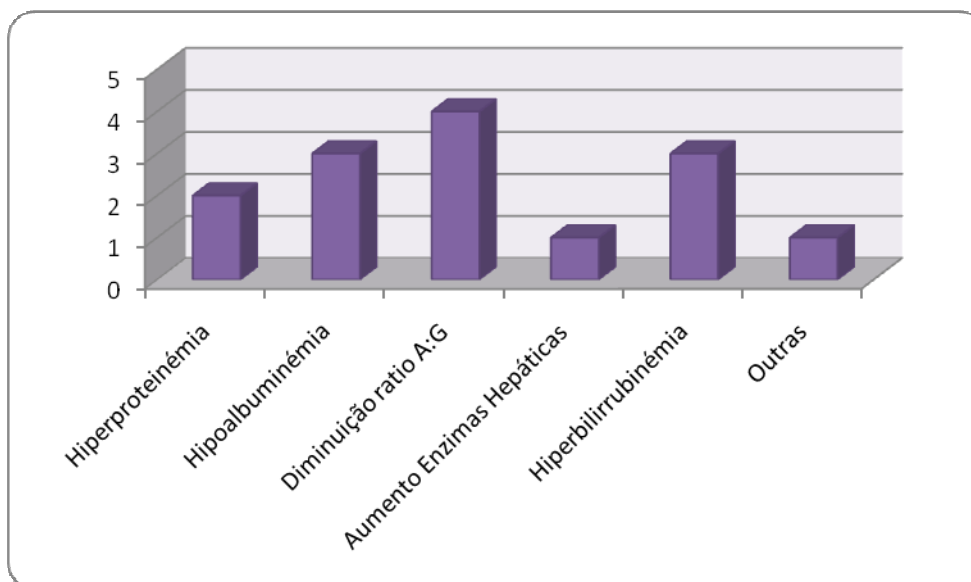
Alteração Hemograma	43LVI/10	68LVI/10	87LVI/10	112LVI/10	117LVI/10
Anemia	x			x	x
Leucocitose			x	x	x
Leucopenia					
Neutrofilia			x	x	x
Neutropenia					
Linfocitose			x	x	
Linfopenia	x	x			x
Trombocitopenia	x		x	x	x
Outras	x (Monocitose)		x (Monocitose)		x (Monocitose)

² Sinais provocados por Infecção concomitante por Calicivírus Felino (Schorr-Evans, *et al.*, 2003).

3.1.4. Alterações do Perfil Bioquímico Sanguíneo

A alteração do perfil bioquímico sanguíneo mais frequente foi a diminuição do rácio A:G que ocorreu em 4 casos (80%). Em 60% dos animais verificou-se hipoalbuminémia e aumento da bilirrubina total. Em 2 gatos verificou-se hiperproteinémia.

Gráfico 4: Distribuição das alterações no perfil bioquímico da população.



Apenas num animal se verificou o aumento das enzimas hepáticas (Gráfico 4). Noutro caso houve diminuição das proteínas totais (Tabela 7).

Tabela 7: Alterações do Perfil Bioquímico Sanguíneo apresentadas por cada animal.

Alteração Perfil Bioquímico Sanguíneo	43LVI/10	68LVI/10	87LVI/10	112LVI/10	117LVI/10
Hiperproteinémia		x			x
Hipoalbuminémia			x	x	
Diminuição rácio A:G		x (0,67)	x (0,32)	x (0,3)	x (0,37)
Aumento Enzimas Hepáticas			x		
Hiperbilirrubinémia	x		x	x	
Outras	x (Hipoproteinémia)				

3.2. Carga Viral

A interpretação das curvas resultantes da amplificação do fragmento alvo na reacção de *Real Time* RT-PCR permite determinar a carga viral das amostras. As figuras 20 e 21 exemplificam as curvas possíveis para uma amostra positiva à presença do vírus e para uma amostra negativa, respectivamente.

Figura 21: Curva de Amplificação de uma amostra positiva ao FCoV.

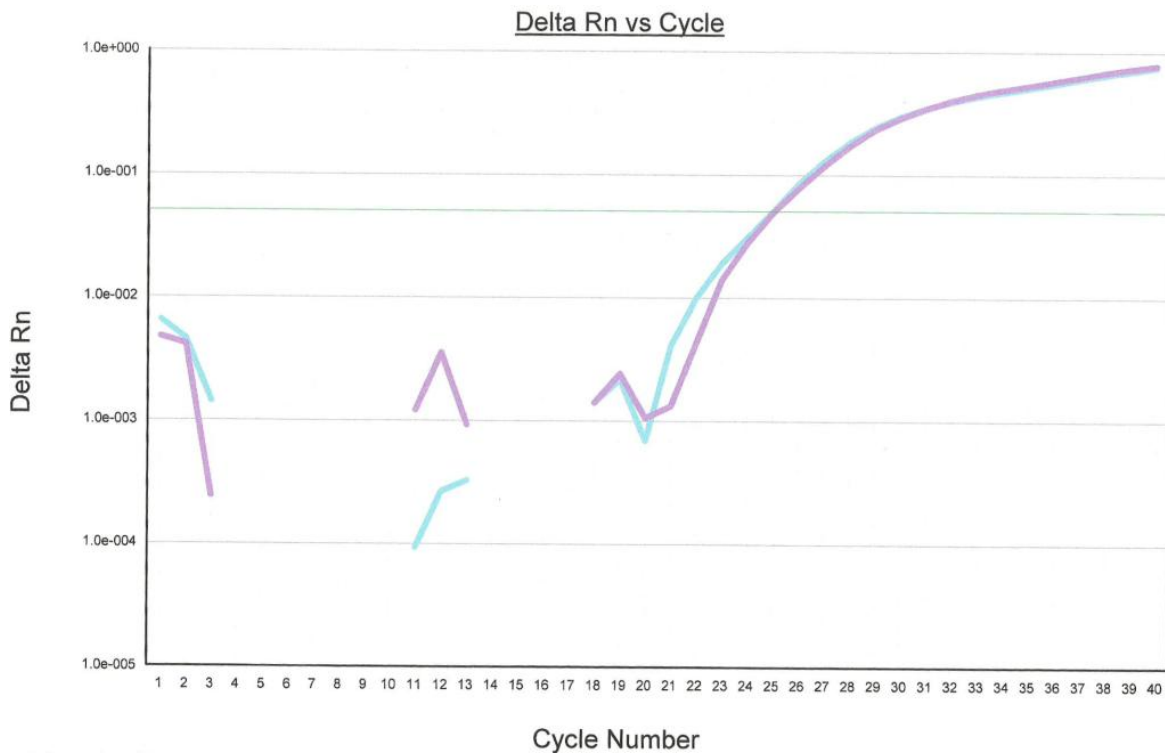
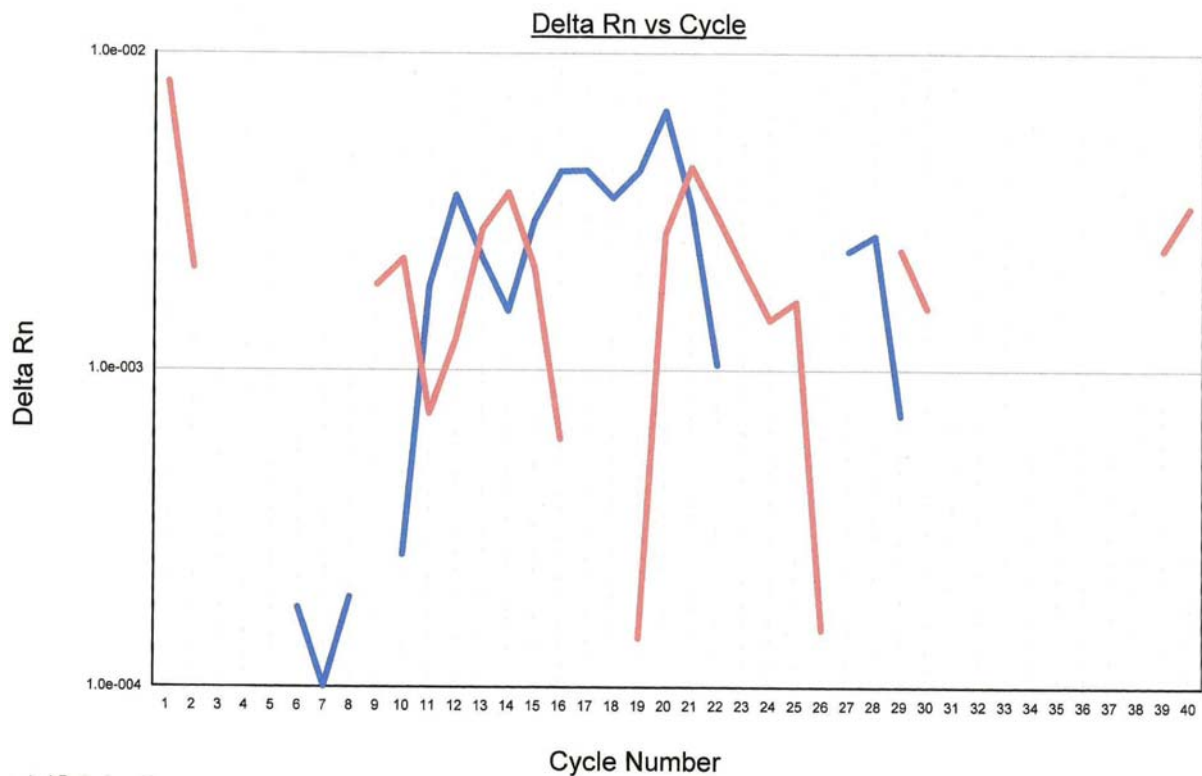


Figura 22: Curva de Amplificação de uma amostra negativa ao FCoV.



3.2.1. Grupo I

Só foi possível quantificar as cargas virais dos animais deste grupo em 4 gatos. O animal excluído não revelou a presença do FCoV nem na zaragatoa rectal nem no sangue, pelo que não foi possível determinar a carga viral. A Tabela 8 reúne os resultados obtidos. A

média das cargas virais obtidas das amostras recolhidas por zaragatoa foi de $8,61 \times 10^4$ moléculas/ μl e a obtida a partir do líquido de derrame foi de $1,47 \times 10^6$ moléculas/ μl .

Tabela 8: Cargas virais obtidas das amostras dos gatos do Grupo I.

Identificação da amostra	Carga Viral (moléculas/ μl)
43 LVI/10 Zaragatoa Rectal	$1,69 \times 10^5$
68 LVI/10 Zaragatoa Rectal	$3,11 \times 10^3$
87 LVI/10 Líquido de Derrame	$1,00 \times 10^5$
112 LVI/10 Líquido de Derrame	$2,82 \times 10^6$

3.2.2. Grupo II

Os gatos incluídos neste grupo foram inicialmente considerados suspeitos de PIF, não se tendo confirmado a doença. No entanto, estes animais revelaram a presença do FCoV, tendo sido possível determinar as suas cargas virais (Tabela 9). A média dos valores obtidos neste grupo foi $8,94 \times 10^3$ moléculas/ μl .

Tabela 9: Cargas virais dos gatos do Grupo II.

Identificação do Animal	Carga viral (moléculas/ μl)
11 LVI/10 Zaragatoa Rectal	$2,45 \times 10^2$
21 LVI/10 Zaragatoa Rectal	$4,86 \times 10^3$
34 LVI/10 Zaragatoa Rectal	$1,77 \times 10^3$
41 LVI/10 Zaragatoa Rectal	$5,23 \times 10^1$
82 LVI/10 Zaragatoa Rectal	$4,38 \times 10^4$
91 LVI/10 Zaragatoa Rectal	$2,89 \times 10^3$

3.2.3. Grupo III

Este grupo é composto pelos gatos saudáveis que revelaram a presença de FCoV nas fezes. Os resultados obtidos são apresentados nas Tabelas 10 e 11:

Tabela 10: Cargas virais obtidos dos animais incluídos no Grupo III.

Identificação da amostra	Carga viral (moléculas/ μ l)
27	$1,37 \times 10^4$
28	$2,38 \times 10^4$
29	$1,78 \times 10^2$
30	$5,40 \times 10^2$
31	$1,04 \times 10^4$
32	$4,06 \times 10^3$
33	$3,97 \times 10^3$
34	$1,18 \times 10^2$
36	$1,35 \times 10^4$
37	$3,01 \times 10^2$
39	$3,70 \times 10^4$
40	$1,69 \times 10^4$
42	$9,22 \times 10^2$
44	$3,98 \times 10^3$
45	$3,01 \times 10^1$
46	$1,39 \times 10^2$
47	$2,03 \times 10^2$
48	$7,32 \times 10^0$
52	$2,20 \times 10^1$
57	$5,37 \times 10^2$
75	$1,05 \times 10^4$
76	$4,65 \times 10^4$
77	$6,46 \times 10^3$
78	$5,91 \times 10^2$
79	$4,11 \times 10^3$
80	$1,47 \times 10^1$
82	$9,33 \times 10^3$
83	$5,81 \times 10^3$
84	$2,78 \times 10^4$
87	$4,92 \times 10^3$
88	$5,46 \times 10^4$
89	$4,22 \times 10^3$
90	$1,57 \times 10^4$
91	$4,05 \times 10^3$

Tabela 11: Distribuição dos animais por ordem de grandeza da carga viral.

Ordem de Grandeza	Número de animais	Porcentagem
$< 10^2$	4	11,8%
10^2	9	26,5%
10^3	10	29,4%
10^4	11	32,3%

Cerca de um terço dos animais tinha cargas virais na ordem dos 10^4 . Com grandezas inferiores, de 10^3 e 10^2 , surgem 29,4% e 26,5% dos animais. Apenas 11,8% dos animais apresentavam cargas inferiores a 10^2 .

A média do valor das cargas virais é de $9,56 \times 10^3$. Não se calculou o desvio padrão da amostra pela disparidade dos dados obtidos, como retratam o valor mínimo $7,32 \times 10^0$ e o valor máximo $5,46 \times 10^4$.

3.3. Titulação de Anti-corpos

Dos 6 animais a que foi possível fazer a titulação dos anticorpos, 33,3% não exibiam anticorpos; ambos os animais pertenciam ao Grupo III: portadores sãos do FCoV.

Os restantes animais apresentavam títulos de anticorpos muito díspares como pode ser constatado na Tabela 12.

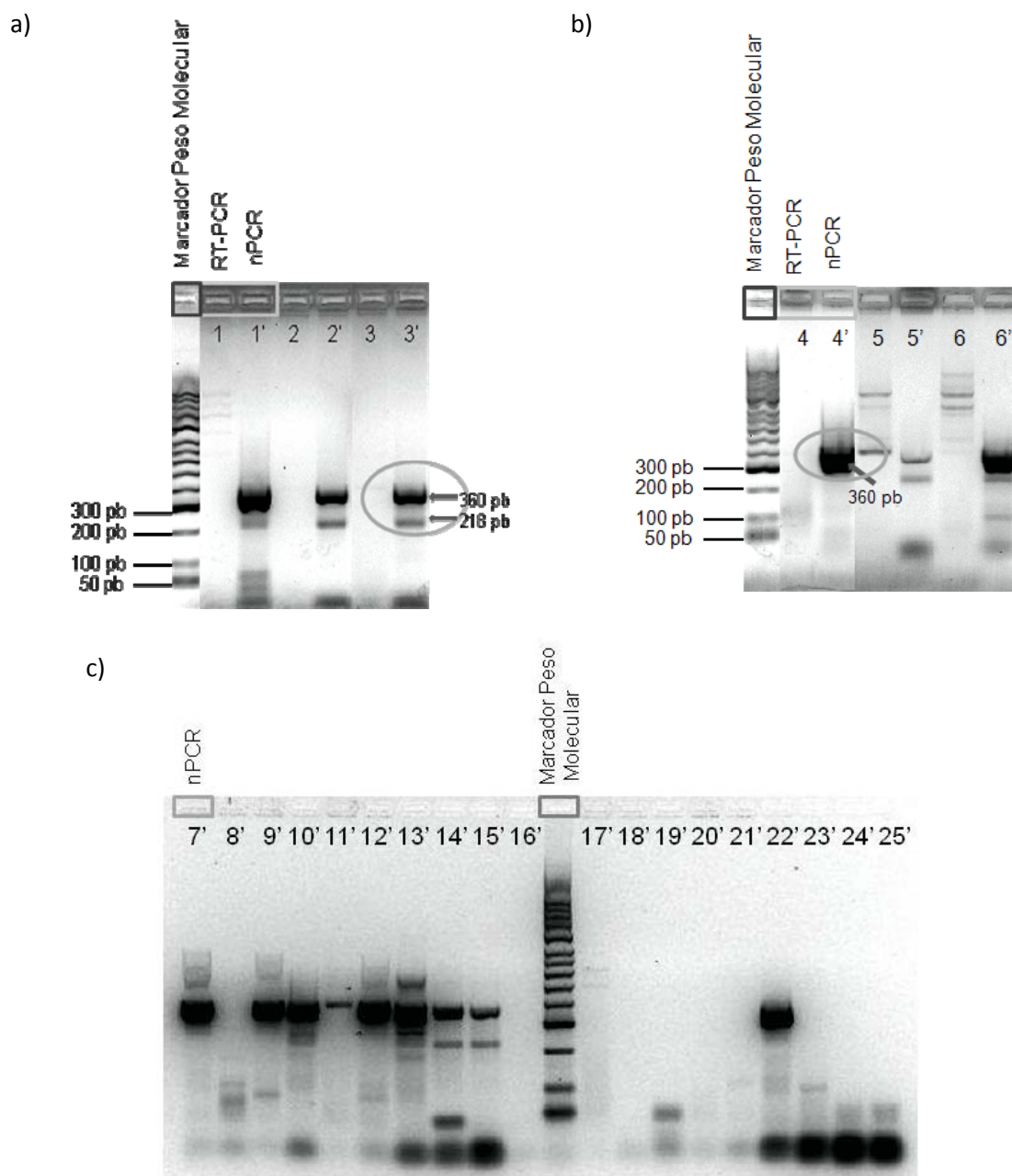
Tabela 12: Cargas virais e títulos de anti-corpos.

Identificação da amostra	Carga viral	Título de anticorpos
68 LVI/10 Zaragatoa Rectal	$3,11 \times 10^3$	1:12800-1:6400
87 LVI/10 Líquido Derrame	$1,00 \times 10^5$	1:6400
112 LVI/10 Líquido Derrame	$2,82 \times 10^6$	1:3200
42	$9,22 \times 10^2$	>1:12800
48	$7,32 \times 10^0$	Negativo
77	$6,46 \times 10^3$	Negativo

3.4. Determinação do Genótipo do FCoV

A partir de 36 amostras, provenientes dos 3 grupos foi possível determinar a genotipificação do FCoV responsável pela infecção. Obtiveram-se os seguintes resultados reunidos nas Figuras 23 a), 23 b) e 23c) e resumidos na Tabela 13.

Figura 23 (a, b e c): Migração dos fragmentos resultantes do RT-PCR e nPCR no gel de Agarose.



Legenda: N – poço com os produtos da reacção RT-PCR; N' – poço com os produtos de reacção da reacção nPCR. O marcador de peso molecular utilizado foi sempre o mesmo.

Na Figura 23 a) verifica-se que todas as amostras revelaram a presença de bandas características de ambos os génotipos no poço correspondente ao nPCR (360pb para o FCoV tipo I e 218pb para o tipo II, como indicado pelas setas na Figura). Deste modo, conclui-se que estes gatos estavam co-infectados.

Na Figura 23 b), no poço 4' observa-se apenas uma banda corresponde aos 360pb, ou seja, o animal em causa estava infectado com o FCoV tipo I.

Nos poços 5 e 6, tal como na Figura 23 a), observa-se amplificação de fragmentos de ambos os tipos, o que indica que estes gatos também estavam co-infectados.

Na figura 23 c), nota-se nos poços 7', 9', 11', 12' e 22' uma banda mais evidente que corresponde aos 360pb, ou seja, as amostras possuíam o tipo I FCoV. Nos poços 10', 14' e 15' estão presentes duas bandas, uma correspondente aos 360pb e outra aos 218pb, indicando que estes gatos estavam co-infectados.

Nos poços 17' a 21' não se visualizam fragmentos amplificados, pelo que não foi possível determinar o tipo presente nas respectivas amostras.

Os resultados referidos acima foram depois relacionados com a presença ou a ausência de PIF (Tabela 13).

Tabela 13: Serotipificação do FCoV presente nas amostras (n=36).

	Sem PIF	Com PIF	
FCoV Tipo I	10	3	13
FCoV Tipo II	6	0	6
FCoV Tipo I + FCoV Tipo II	15	2	17
	31	5	36

Conclui-se que 47,2% dos gatos testados estavam co-infectados, 36,1% estavam infectados apenas com o FCoV tipo I e 16,7% com o FCoV tipo II.

Três gatos com PIF estavam infectados pelo FCoV tipo I, 2 co-infectados, nenhum exibiu infecção só por FCoV tipo II.

4. Discussão

4.1. Apresentação clínica (Grupo I)

4.1.1. Características da amostra investigada

O Grupo I era composto por 5 animais, dos quais 4 eram machos (80%) e apenas 1 era fêmea (20%). Rhorbach *et al.* (2001) e Benetka *et al.* (2004) referem que a PIF é mais comum em machos que em fêmeas, sugerindo que estejam envolvidas questões hormonais na capacidade da resposta imunitária, ainda não identificadas.

Neste Grupo observou-se uma maior proporção de gatos afectados no escalão etário dos 0 aos 2 anos de idade (60%), o que também foi reportado por Rhorbach *et al.* (2001) e por Bell *et al.* (2006). Um dos animais desta faixa etária tinha apenas 5 meses, idade à qual o sistema imunitário ainda não é capaz de uma resposta imunitária plena, o que facilita a replicação viral e, assim, aumenta a probabilidade de ocorrer a mutação essencial à doença

(Hartmann, 2005; Day, 2007). Os outros dois gatos tinham 12 e 15 meses, altura em que os níveis de imunoglobulinas e contagens de linfócitos, em particular dos B e T CD8⁺, já são semelhantes aos dos adultos (Day, 2007). O gato referido com 12 meses tinha sido adquirido há cerca de 1 mês de uma loja de animais e, como referido por Addie *et al.* (2009), o stress associado a esta alteração ambiental poderá ter induzido uma imunossupressão transitória que permitiu o desenvolvimento da doença.

Em relação ao terceiro gato nenhum dado da história pregressa permite explicar o surgimento da PIF numa fase mais tardia, após a plena maturação do sistema imunitário.

Observaram-se ainda um gato no escalão de mais de 10 anos (20%) e outro gato no escalão dos 4 aos 6 anos (20%). O primeiro caso encaixa no segundo pico etário de incidência mais elevada da doença registado por Rhorbach *et al.* (2001) e por Bell *et al.* (2006). Os animais com idade superior a 10 anos estão mais susceptíveis ao vírus, por imunossupressão associada ao enfraquecimento da resposta celular com o avançar da idade, por doença concomitante ou por terapia imunossupressora. Esta última poderá ter sido a causa duma eventual imunossupressão pois o gato tinha história clínica de colite linfoplasmocítica.

O gato que desenvolveu a doença aos 5 anos de idade tinha uma infecção concomitante por Calicivírus felino (FCV), além de ter uma história clínica de infecção do tracto urinário e de internamento. O stress e a imunossupressão associados a estes acontecimentos poderão ter despoletado o desenvolvimento da PIF (Addie *et al.*, 2009).

Relativamente à distribuição racial dos casos não é possível compará-la com estudos anteriores, pelas seguintes razões: a amostra é demasiado pequena, a grande maioria dos animais são de raça indeterminada, as raças representadas (Persa e Siamês) não parecem estar em risco acrescido (Pesteanu-Somogyi *et al.*, 2006). Além disso não existe informação acerca da existência e distribuição de raças de gatos em Portugal que permita comparação com os dados obtidos neste estudo (J. Noronha, Presidente do Clube Português de Felinicultura, comunicação pessoal, Novembro 9, 2010).

4.1.2. Sinais clínicos

Os sinais clínicos são muito variados, incluindo uma combinação de prostração, anorexia, febre, perda de condição corporal, vômito, diarreia, distensão abdominal, dispneia, organomegália abdominal palpável (renal neste estudo), linfadenomegália, mucosas pálidas e/ou ictéricas, sinais oculares e outros.

Neste Grupo (n=5), 4 gatos manifestaram a forma húmida (80%) e 1 a forma seca (20%) da PIF. Esta distribuição é concordante com a descrita na literatura: a forma húmida continua a ser a mais frequente, apesar da prevalência da forma seca estar a aumentar (Pedersen, 2009). Hartmann, *et al.* (2003) encontraram exactamente as mesmas proporções para cada forma da doença que nós.

Prostração e anorexia foram os sinais clínicos mais frequentes nos gatos reunidos neste estudo, sendo também sinais clínicos comuns a ambas as formas da doença. Norris *et al.* (2005) referem proporções similares às obtidas no nosso estudo, embora a anorexia exiba um resultado inferior (98% *versus* 80%).

A febre é o sinal clínico inespecífico de PIF mais frequente e comum a ambas as formas da doença. Neste estudo foi registada em 3 dos 5 animais (60%), muito semelhante aos 63% registados por Norris *et al.* (2005).

Tal como descrito por Norris *et al.* (2005) e por Pedersen (2009), a dilatação abdominal (60%) foi mais frequente que a dispneia (40%).

60% dos gatos manifestaram vômito e/ou diarreia, percentagem duas vezes superior à determinada por Norris *et al.* (2005).

Infelizmente, a linfadenomegália reportada neste estudo (n=1) não diferenciou quais os linfonodos aumentados. Em estudos anteriores, esta proporção também não é muito elevada, rondando os 9,5% em relação aos linfonodos periféricos e os 12,5% nos linfonodos mesentéricos (Norris *et al.*, 2005). De um modo geral, o aumento dos linfonodos circunscreve-se às cavidades abdominal e torácica (Pedersen, 2009), o que pode ajudar a perceber a baixa proporção de detecção do aumento dos linfonodos periféricos.

A perda de condição corporal e a coloração ictérica das mucosas afectaram 2/5 dos animais. Estes aspectos do exame físico podem estar associados a ambas as formas de expressão da doença, tal como reportado por Hartmann (2005), Addie *et al.* (2009) e Pedersen (2009).

No estudo de Norris *et al.* (2005), a perda de condição corporal é um dos sinais mais frequentes (88%), o que não foi observado por nós, pois só observámos este sinal clínico em 40% dos animais. Em relação à apresentação de mucosas ictéricas, os resultados obtidos neste trabalho foram superiores: 40% *versus* 26% em Norris *et al.* (2005).

Em menor proporção surge a palidez das mucosas (20 %) embora seja um sinal bem mais comum que o verificado (68% segundo Norris *et al.*, 2005). Proporções baixas foram também registadas para repercussões oculares (20%) e não se registaram sinais neurológicos, o que é concordante com o descrito na bibliografia (Norris *et al.*, 2005; Pedersen, 2009). As alterações oculares, uveíte anterior e depósitos queráticos, ocorreram apenas no caso de PIF seca, o que é corroborado por Colitz (2005) e Pedersen (2009).

Os sinais clínicos designados como *outros* incluíram: úlceras orais, edema da face e dos membros devido a infecção concomitante por FCV (Schorr-Evans, Poland, Johnson & Pedersen, 2003); atraso no crescimento, mais frequente em jovens como no animal em causa; renomegália, verificada num gato com a forma seca de PIF (20%), embora a percentagem aferida por Norris *et al.* (2005) seja inferior (7,1%).

4.1.3. Alterações do Hemograma

Dos 5 gatos reunidos neste grupo, foi possível recolher dados sobre o hemograma e o perfil bioquímico sanguíneo.

A alteração mais frequente foi trombocitopenia em 80% dos animais. Na PIF, a trombocitopenia não é frequente, ocorrendo geralmente associada a CID (Hartmann, 2005; Addie *et al.*, 2009), pelo que esta proporção tão elevada se pode dever à colheita difícil da amostra e a erros laboratoriais, comuns na contagem de plaquetas em gatos (Papasouliotis, 2010).

Um segundo grupo de alterações bastante frequentes reuniu a anemia, a linfopenia e a leucocitose, sempre com neutrofilia associada, em 60% dos gatos investigados. A linfopenia é uma das alterações mais frequentes na PIF, podendo ocorrer em até 75% dos animais (Sparkes *et al.*, [1994], citado por Gruffydd-Jones, 2009), embora Norris *et al.* (2005) só tenha registado linfopenia em 55% dos animais. O nosso resultado encontra-se dentro deste intervalo. A proporção de casos com leucocitose e neutrofilia que detectámos também é sustentada por estudos anteriores (Sparkes *et al.*, [1994], citado por Gruffydd-Jones, 2009; Norris *et al.*, 2005), 50% e 55%, respectivamente.

Um leucograma de stress (neutrofilia com linfopenia) pode ocorrer na PIF mas também noutras doenças (Hipertiroidismo, Hiperadrenocorticismo felino, Diabetes mellitus...) (Paltrinieri *et al.*, 2001; Addie & Jarret, 2006). Curiosamente, a neutrofilia e a linfopenia foram resultados que nunca ocorreram simultaneamente nos gatos que investigámos.

A proporção de gatos com anemia não regenerativa está de acordo com o relatado por Norris *et al.* (2005) que registou esta alteração em 54%, mas acima dos 40% descritos por Sparkes *et al.* (1994, citado por Gruffydd-Jones, 2009).

A linfocitose é pouco frequente (3% de acordo com Norris, *et al.*, 2005) mas neste estudo ocorreu em 2 casos.

Surpreendentemente, 60% dos casos de PIF apresentaram monocitose, o que está pouco descrito (Paltrinieri *et al.*, 2001; Diaz & Poma, 2009). Esta alteração pode estar associada à inflamação piogranulomatosa e à própria infecção viral (Gough, 2007). Especula-se que na infecção por CCV esta alteração surja em consequência da linfopenia, como compensação por parte da resposta imunitária inata, como ocorre no HIV (Marinero, Mari, Bellacicco, Taritano, Elia, Losurdo, Rezza, Buonavoglia & Decaro, 2010).

4.1.4. Alterações do Perfil Bioquímico Sanguíneo

A alteração bioquímica mais consistente na PIF é o aumento das proteínas totais séricas, o que ocorre em aproximadamente 50% dos gatos com a forma exsudativa e em 70% com a forma seca (Hartmann *et al.*, 2003; Sharif *et al.*, 2010). Neste estudo apenas se verificou este aumento em 40% dos animais, 1 com a forma seca e 1 com a forma húmida.

O aumento das PT pode estar associado a um aumento das globulinas séricas, nomeadamente das γ -globulinas (Sharif *et al.*, 2010). Mais que os parâmetros anteriores, o rácio A:G tem um valor de diagnóstico consistente nesta doença (Hartmann, 2005; Addie & Jarret, 2006), tendo-se verificado a sua diminuição em 4 dos animais. Destes, 3 revelaram um rácio inferior a 0,4, valor que é um indicador muito forte de PIF (Addie & Jarret, 2006).

Outra alteração frequente neste estudo foi hiperbilirrubinémia (60%), embora apenas 2 deles apresentassem coloração ictérica das mucosas. Esta proporção é superior à registada por Norris, *et al.*, (2005) (48%) e por Sparkes *et al.*, ([1994], citado por Gruffydd-Jones, 2009) (25%). A hiperbilirrubinémia é frequente, mesmo na ausência de icterícia, em gatos com PIF, em especial na forma exsudativa (Pedersen, 2009), como também se verificou neste estudo (2 dos gatos com hiperbilirrubinémia padeciam da forma húmida e 1 da forma seca). Também 2/3 dos gatos afectados possuíam menos de 3 anos de idade, o que é corroborado na revisão de Pedersen (2009), que refere que a PIF é a maior causa de hiperbilirrubinémia em gatos jovens.

O aumento das enzimas hepáticas também ocorre nesta doença, em particular quando há afecção hepática (Hartmann, 2005). Neste estudo apenas um animal (20%) demonstrou aumento da FAS e da ALT, o que é superior aos 13% registados por Norris *et al.* (2005).

O caso com infecção concomitante por FCV apresentou hipoproteinémia e hiperbilirrubinémia, ambas alterações compatíveis com Calicivirose (Schorr-Evans *et al.*, 2003). Neste caso o aumento da bilirrubina total pode ser explicado por ambas as infecções.

4.2. Apresentação clínica, cargas virais e titulação de anticorpos

A complexidade que envolve todo o processo de desenvolvimento da PIF, desde as características do vírus à complexidade da resposta imunitária que desencadeia, torna relevante compreender a forma como o título de anticorpos e a carga viral dos animais doentes podem influenciar a apresentação clínica dos animais. Com esse objectivo, quantificámos as cargas virais e medimos os títulos de anticorpos dos gatos investigados.

4.2.1. Cargas virais

A média de cargas virais obtidas a partir das zaragatoas rectais foi de $8,61 \times 10^4$ moléculas/ μ l para o Grupo I, $8,94 \times 10^3$ para o Grupo II e $9,56 \times 10^3$ para o Grupo III. Constata-se que os animais com PIF, reunidos no Grupo I, tinham cargas virais superiores às dos outros Grupos.

Os valores de carga viral obtidos no Grupo I foram ligeiramente inferiores aos obtidos no estudo de Meli *et al.* (2004), no qual se registaram cargas virais elevadas sem que os animais exibissem qualquer sintoma. De acordo com estes autores, a presença de cargas virais

elevadas em animais saudáveis reflecte o que acontece na Natureza, em que cargas virais elevadas são uma forma do vírus gerar estirpes virulentas (Meli *et al.*, 2004).

Não existem mais estudos que comparem as cargas virais fecais, ou seja, a excreção fecal quantitativa do vírus, com a apresentação clínica do animal.

Kipar *et al.* (2006a) quantificaram a carga viral em órgãos hemolinfáticos pela sua riqueza em macrófagos/monócitos e tropismo do FIPV para estas células. Estes investigadores encontraram cargas virais superiores (medula óssea: $p=0,0273$, linfonodos mesentéricos: $p=0,0029$, baço: $p=0,0037$) em órgãos de animais doentes em comparação com os de animais saudáveis, sugerindo que o aumento da capacidade de replicação viral pode ser essencial ao desenvolvimento da PIF, mas que também uma redução da capacidade dos gatos com PIF em eliminar o vírus seja responsável pelo aumento das cargas virais. É desta forma legítimo sugerir que cargas virais elevadas são mais prováveis em animais doentes com PIF, e que gatos imunocompetentes consigam eliminar a infecção.

Kipar *et al.* (2010) identificaram o cólon como o principal local de persistência da infecção e, provavelmente, de excreção recorrente, representando uma possível fonte de virémia tal como medula óssea, linfonodos mesentéricos e baço, o que revela que possivelmente se poderá fazer uma assumpção para a carga viral fecal como Kipar *et al.* (2006a) fizeram para os tecidos hemolinfáticos. No entanto, os dados obtidos por nós não permitem tirar conclusões, ficando esta hipótese ainda em aberto.

As cargas virais obtidas no Grupo III revelam uma grande variação. Todos os animais pertencentes a este Grupo apresentaram-se saudáveis ao exame clínico, contudo não se conhecem dados acerca da origem, duração da estadia no gatil, idade, estado FIV/FeLV, entre outros, que permitam justificar estas variações e eventualmente tirar algumas ilações.

A média de cargas virais obtidas no líquido de derrame foi de $1,47 \times 10^6$ moléculas/ μ l. Os valores de carga viral detectados no líquido de derrame foram mais elevados que os valores detectados nas fezes, tal como esperado (Pedersen, 2009), embora não existam dados acerca desses valores que permitam estabelecer comparações.

4.2.2. Titulação de Anticorpos e Cargas Virais

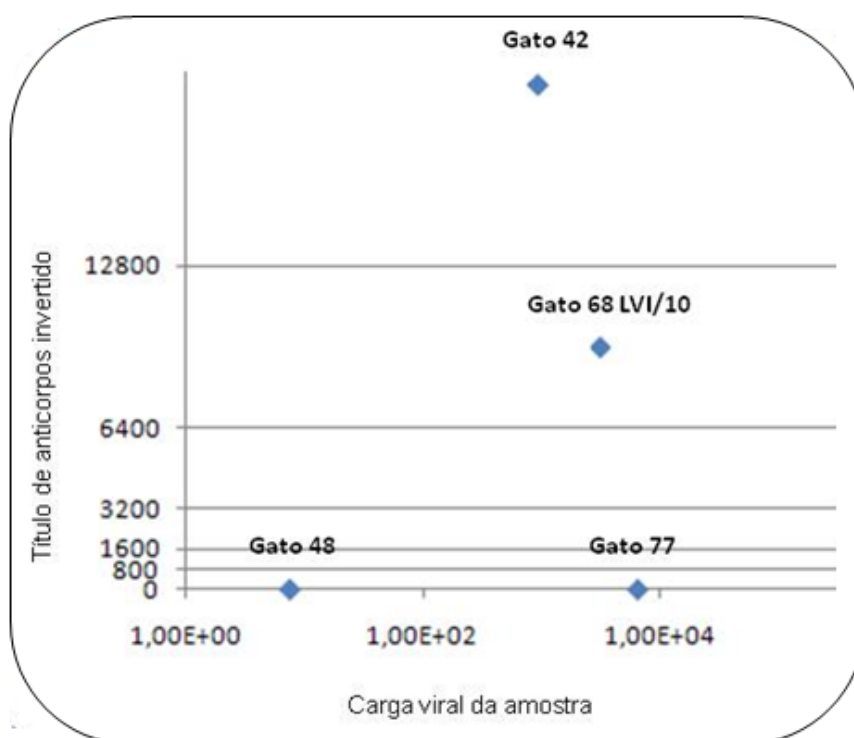
O papel dos anticorpos na PIF ainda não está totalmente esclarecido. Autores como Gonon *et al.* (1999) já evidenciaram a sua importância na eliminação da infecção mas, por outro lado, os anticorpos podem estar implicados em reacções de hipersensibilidade tipo III que promovem a vasculite (Kipar *et al.*, 2005) e na ADEI (Groot-Mijnes *et al.*, 2005) que facilitam o desenvolvimento da doença. No entanto, são necessários mais estudos para confirmar o primeiro processo referido (Kipar *et al.*, 2005) e o segundo apenas provou importância *in vitro* (Pedersen, 2009).

A presença de anticorpos indica o contacto do gato com o FCoV, uma vez que 95 a 100% dos animais expostos ao vírus, infectam-se e tornam-se seropositivos 18 a 21 dias após a

exposição inicial (Addie & Jarret, 2006). Estes animais podem eliminar a infecção e seronegativar no espaço de meses (Addie & Jarret, 2006).

Se por um lado a detecção serológica indica o contacto com o FCoV, condição *sine qua non* para a PIF, a determinação do título de anticorpos dá uma ideia da replicação viral intestinal, uma vez que se correlaciona com a excreção fecal do vírus, apurada através das cargas virais fecais (Gut, 1999 citado por Meli *et al.*, 2004; Addie & Jarret, 2001). No entanto, esta não é uma correlação absoluta (Addie & Jarret, 2001) como se verificou nos dados obtidos neste estudo (Gráfico 5), em se encontrou um gato seronegativo excretando (Gato 77), e títulos bastante diferentes para cargas virais semelhantes (Gatos 68LVI/10, 42 e 77).

Gráfico 5: Relação entre a carga viral e o título de anticorpos.



Verificou-se que os animais com diagnóstico de PIF tinham títulos de anticorpos elevados, indicativos da doença de acordo com as premissas descritas na bula do teste. Num dos animais doentes obteve-se um título inferior a 1:6400, que poderia relegar a PIF para segundo plano na lista de diagnósticos diferenciais. No entanto, este gato manifestou a forma húmida da doença com extenso derrame abdominal, no qual podiam estar sequestrados os anticorpos, impossibilitando-os assim de serem detectados pelo teste (Addie *et al.*, 2004; Hartmann, 2005). Infelizmente, não foi possível determinar o título de anticorpos nos animais doentes que expressaram a forma seca de PIF, e verificar se como é referido na literatura, estes animais possuem títulos de anticorpos superiores aos que apresentam a forma húmida (Addie & Jarret, 2006).

Os gatos portadores são do FCoV testados revelaram resultados díspares: dois foram seronegativos e um exibiu um título superior a 12800, maior que os determinados para os

gatos doentes. Uma das explicações possíveis para a excreção do vírus em animais seronegativos é o facto de a replicação viral se encontrar confinada ao intestino, pelo menos numa fase inicial, não induzindo seroconversão (Meli *et al.*, 2004). Estes 3 gatos testados provinham de um gatil, locais onde geralmente a infecção por FCoV é endémica. Como não sabemos mais nada acerca da sua história clínica e do tempo de permanência no gatil, torna-se difícil interpretar esta disparidade de resultados.

4.2.3. Relação entre apresentação clínica, cargas virais e titulação de anticorpos

Estudos anteriores revelaram existir uma correlação entre a excreção viral e o título de anticorpos (Gut, 1999, citado por Meli *et al.*, 2004; Addie *et al.*, 2003). Outros estudos demonstraram que animais com PIF têm cargas virais mais elevadas nos tecidos hemolinfáticos que animais portadores sãos do FCoV (Kipar *et al.*, 2005). Por outro lado, houve ainda estudos que detectaram a presença de cargas virais elevadas também em gatos saudáveis (Meli *et al.*, 2004).

No presente estudo pretendeu-se relacionar a excreção viral (através da determinação da carga viral via zaragatoa rectal) com a titulação de anticorpos e determinar a sua influência na apresentação clínica. Os dados são disponibilizados de forma sintética na Tabela 14.

No caso do Gato 43 LVI/10 não se incluiu o edema da face e membros, nem as úlceras orais e hipoproteinémia por serem sinais clínicos provocados pela co-infecção por FCV (Schorr-Evans *et al.*, 2003).

Para melhor interpretação dos dados agruparam-se os animais referidos na Tabela 14 de acordo com as informações obtidas.

Ao analisar em conjunto os gatos designados por 87LVI/10 e 112LVI/10, verifica-se que ambos manifestaram a forma exsudativa da PIF. Nenhum destes animais revelou a presença de FCoV na zaragatoa rectal. Não tendo sido possível determinar a carga viral fecal fez-se a mesma determinação no líquido de derrame drenado logo na primeira consulta. Nota-se que o Gato 112LVI/10 possui uma carga viral superior. Este mesmo animal, apresentou-se à consulta em pior condição: maior diversidade de sinais clínicos e de alterações laboratoriais.

Nestes Gatos verificou-se, então, que uma carga viral maior correspondeu a uma apresentação clínica mais grave.

Em relação ao título de anticorpos de ambos os animais, o 87LVI/10 apresentou um título superior ao 112LVI/10. Esta diferença pode ser explicada pelo facto de o 112LVI/10 possuir uma carga viral maior no derrame, partículas virais às quais poderiam estar ligados aos anticorpos, impossibilitando-os de serem detectados no teste, como já foi referido.

Tabela 14: Compilação dos dados obtidos.

Identificação do Animal	Apresentação clínica	Alterações Hemograma	Alterações Bioquímicas	Carga viral	Título de anticorpos
43LVI/10 (5 A, M, PxS)	Prostração Anorexia Sinais GI Dilatação abdominal Mucosas Ictéricas	Anemia Linfopénia Monocitose	Hiperbilirrubinémia	1,69x10 ⁵ (Z)	n. d.
68/LVI/10 (12 A, M, S)	Prostração Anorexia Febre Dispneia	Linfopénia	Hiperproteinémia Diminuição A:G	3,11x10 ³ (Z)	1:12800- 1:6400
87LVI/10 (15 Ms, M, SRD)	Febre Perda CC Dilatação abdominal Dispneia	Leucocitose Neutrofilia Linfocitose Monocitose	Hipoalbuminémia Diminuição A:G Aumento FAS e ALT Hiperbilirrubinémia	1,00x10 ⁵ (L)	1:6400
112LVI/10 (5 Ms, M, SRD)	Prostração Anorexia Febre Sinais GI Dilatação abdominal Mucosas pálidas e ictéricas	Anemia Leucocitose Neutrofilia Linfocitose	Hipoalbuminémia Diminuição A:G Hiperbilirrubinémia	2,82x10 ⁶ (L)	1:3200
42	Saudável	-	-	9,22x10 ²	>1:12800
48	Saudável	-	-	7,32x10 ⁰	Negativo
77	Saudável	-	-	6,46x10 ³	Negativo

Legenda: A – anos; Ms – Meses; M – Macho; F – Fêmea; CC – Condição Corporal; GI – Gastrointestinais; Z – zaragatoa rectal; L – Líquido de Derrame; A:G - Albumina:Globulinas; n. d. – Não determinado

Em relação ao par formado pelos Gatos 43LVI/10 e 68LVI/10, constata-se que também é o animal que ostenta maior carga viral, desta feita determinada nas fezes, que se apresenta em pior condição à consulta. No entanto, esta assumpção não pode ser feita apenas com base na infecção por FCoV, uma vez que este era o animal com infecção concomitante por FCV, que só por si também induz imunossupressão facilitando a replicação viral.

Nos Gatos 68LVI/10, 42, 48 e 77 foi possível medir as cargas virais fecais e o título de anticorpos. Neste subgrupo verifica-se que o animal doente não foi o que apresentou a carga viral mais elevada, mas tinha um título de anticorpos compatível com a doença (de acordo com as instruções do kit).

O escasso número de animais não permitiu aferir conclusões em relação aos objectivos pretendidos, nomeadamente evidenciar associação estatística entre a apresentação do animal à consulta, a carga viral fecal e o título de anticorpos.

4.3. Genotipificação do FCoV

Vários estudos indicam que a grande maioria dos isolados de campo, cerca de 90%, no Japão, Estados Unidos (Addie *et al.*, 2003) e Portugal (Duarte *et al.*, 2009) pertencem aos FCoV tipo I. Neste estudo não foi o que se verificou, uma vez que apenas 36,1% dos gatos investigados estavam infectados por este tipo do FCoV. A percentagem de co-infectados neste estudo foi muito superior ao até agora relatado: 47,2% contra 7% de Benetka *et al.* (2004).

No estudo de Kummrow *et al.* (2005) verificou-se que nenhum dos gatos com PIF possuía em exclusivo o tipo II do FCoV. O mesmo foi observado no nosso estudo em que de facto, todos os animais doentes foram positivos para o tipo I ou para os dois tipos em simultâneo. É sugerido que a melhor adaptação do tipo I aos gatos permite que este vírus se replique com mais facilidade tornando-se mais patogénico. No entanto, outros estudos têm descrito o oposto, ou seja, que será o tipo II mais frequentemente implicado na PIF (Addie *et al.*, 2003; Duarte *et al.*, 2009; Lin *et al.*, 2009).

Benetka *et al.* (2004) concluíram que ambos os tipos podem despoletar a doença, assim como ambos podem estar presentes em gatos portadores sãos de FCoV.

5. Conclusões

O reduzido número de animais investigados não permitiu atingir todos os objectivos pretendidos. Tal deveu-se à reduzida incidência de PIF na população de gatos que frequenta o Hospital Escolar da FMV, a qual se caracteriza sobretudo por animais que vivem em apartamentos da cidade de Lisboa. Tendem a ser o único animal de companhia do agregado familiar, não tendo geralmente contactos com outros gatos ou quando esses contactos ocor-

rem são raros e fugazes. Tratam-se, normalmente, de gatos em bom estado geral, com uma dieta equilibrada e que cumprem calendários vacinais e de desparasitação que mitigam a probabilidade de contraírem doenças infecciosas e parasitárias imunossupressoras, nomeadamente viroses. Esta combinação reduz muito a exposição ao FCoV e salvaguarda que a grande maioria destes gatos está em condições de montar uma resposta imunitária plena, caso seja exposta ao vírus.

Para aumentar a probabilidade de detectar animais clinicamente suspeitos de PIF, e dessa forma alargar a amostra estudada, prolongou-se o período de recolha de dados de animais suspeitos além do término do estágio no Hospital Escolar da FMV, mas o pequeno grupo adicional de gatos suspeitos que foi possível reunir, ou se revelou negativo nos exames laboratoriais ou não nos foi permitido retirar resultados conclusivos.

Nos gatos com PIF investigados, confirmámos que manifestaram sinais clínicos e alterações analíticas concordantes com os dados publicados por equipas que estudaram amostras maiores. Foi por essa razão que optámos por fazer uma análise estatística descritiva detalhada dos gatos com PIF por nós identificados, apesar do tamanho da amostra não permitir a realização de estatística inferencial e, conseqüentemente, extrapolações sobre factores/comportamentos de risco. É importante continuar este estudo para verificar se esta tendência é real.

Os nossos dados sugerem que pode haver uma relação entre as cargas virais fecais, ou seja, a excreção fecal quantitativa do vírus, e a apresentação clínica do animal, mas, de novo, é preciso aumentar o tamanho da amostra para confirmar ou rejeitar a hipótese que colocámos. Na ausência de estudos nacionais e no actual cenário de escassez de publicações internacionais sobre esta relação, é importante que este trabalho tenha continuidade, porque ajudará a compreender melhor a patogénese da PIF e dará aos clínicos elementos relevantes para em função da apresentação clínica dos gatos na consulta tomarem as decisões mais adequadas relativamente ao maneio sanitário destes animais.

A componente realizada de titulação de anticorpos nos gatos com PIF confirmou os resultados obtidos por estudos anteriores.

Era interessante completar este estudo, associando não só cargas virais detectadas nas fezes, mas cargas virais no plasma e no líquido de derrame com a apresentação clínica, continuar a relacionar com o título de anticorpos, mas incluindo parâmetros que permitissem avaliar a resposta celular, como por exemplo, determinar a população de linfócitos T por imunofenotipagem ou a medição de TNF- α e IFN- γ .

Finalmente poderia também explorar-se a possibilidade de tornar as cargas virais discriminatórias para diagnóstico de PIF ou pelo menos indicadores de prognóstico. Para tal serão necessários fazer alguns ajustes no protocolo, nomeadamente, a uniformização no registo de dados, realização de análise em fezes em vez de zaragatoas rectais e não recolher

amostras apenas uma vez, mas sim, por exemplo em 4 a 5 dias consecutivos (Hartmann, 2005).

Adicionalmente, dever-se-á continuar a determinar o subtipo do vírus, uma vez que há grande diversidade nos resultados publicados em relação à possibilidade de um ou outro serótipo ser mais causador da doença.

BIBLIOGRAFIA

- Addie, D. D. & Jarrett, O. (2001). Use of a reverse-transcriptase polymerase chain reaction for monitoring the shedding of feline coronavirus by healthy cats. *Veterinary Record*, 148, 649-53. doi:10.1136/vr.148.21.649
- Addie, D. D., Schaap, I. A. T., Nicolson, L. & Jarrett, O. (2003). Persistence and transmission of natural type I feline coronavirus infection. *Journal of General Virology*, 84(10), 2735-2744. doi: 10.1099/vir.0.19129-0.
- Addie, D. D. (2004). Feline coronavirus – that enigmatic little critter. *The Veterinary Journal*, 167, 5–6. doi:10.1016/S1090-0233(03)00083-2
- Addie, D. D., McLachlana S. A., Goldera, M., Ramsey, I. & Jarrett, O. (2004a). Evaluation of an in-practice test for feline coronavirus antibodies. *Journal of Feline Medicine & Surgery*, 6, 63–67. doi:10.1016/j.jfms.2004.01.001
- Addie, D.D., Paltrinieri, S., Pedersen, N. C. (2004b). Recommendations from workshops of the second international feline coronavirus/feline infectious peritonitis symposium. *Journal of Feline Medicine & Surgery*, 6, 125–130. doi:10.1016/j.jfms.2003.12.009
- Addie, D. D. (2005). Diagnosis of Coronavirus and FIP in Cats in *Proceeding of the NAVC North American Veterinary Conference*. Orlando, Florida. Disponível em <http://www.ivis.org/proceedings/navc/2005>
- Addie, D. D., & Jarrett, O. (2006). Feline Coronavirus Infections. In Greene CE (Ed), *Infectious Diseases of the Dog and Cat*, (3rd ed.) . (88-103). St Louis, Missouri: Saunders.
- Addie, D., Belák, S., Boucraut-Baralon, C., Egberink, H., Frymus, T., Gruffydd-Jones, T., et al. (2009). Feline infectious peritonitis. ABCD guidelines on prevention and management. *Journal of Feline Medicine & Surgery*, 11(7), 594-604. doi: 10.1016/j.jfms.2009.05.008.
- Arshad, S. S. (2010). Prevalence of feline coronavirus. *Journal of Feline Medicine & Surgery*, 12, 360. doi:10.1016/j.jfms.2009.11.005
- Baines, E. A. (2009). In O'Brien, R. & Barr, F. J. (Eds.), *BSAVA Manual of Canine and Feline Abdominal Imaging*. (pp. 33-35). Gloucester: British Small Animal Veterinary Association.
- Battilani, M., Coradin, T., Scagliarini, A., Ciulli, S., Ostanello, F., Prosperi, S. & Morganti, L. (2003). Quasispecies composition and phylogenetic analysis of feline coronaviruses (FCoVs) in naturally infected cats. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 39, 141-147. doi:10.1016/S0928-8244(03)00237-2
- Bell, E.T., Toribio, J. A. L. M. L., White J. D., Malik, R. & Norris, J. M. (2006). Seroprevalence study of Feline Coronavirus in owned and feral cats in Sydney, Australia. *Australian Veterinary Journal*, 84 (3), 74-81. doi: 10.1111/j.1751-0813.2006.tb12231.x
- Benetka, V., Kubber-Heiss, A., Kolodziejek, J., Nowotny, N., Hofmann-Parisot, M., Mostl, K., (2004). Prevalence of feline coronavirus types I and II in cats with histopathologically verified feline infectious peritonitis. *Veterinary Microbiology*, 99, 31–42. doi:10.1016/j.vetmic.2003.07.010
- Berg, A. L., Ekman, K., Belák, S., Berg, M. (2005). Cellular composition and interferon-gamma expression of the local inflammatory response in feline infectious peritonitis (FIP). *Veterinary Microbiology*, 111, 15-23. doi:10.1016/j.vetmic.2005.07.017

- Bexfield, H., Lee, K. (Eds.) (2010). *BSAVA Guide to Procedures in Small Animal Practice*. Gloucester: British Small Animal Veterinary Association, pp. 1-3,195-196
- Biller, D. (2008). Diagnostic Imaging: Ultrasound Case Studies in *Proceedings of the Southern European Veterinary Conference & Congreso Nacional AVEPA*. Barcelona, Espanha. Disponível em www.ivis.org
- Boettcher, I. C., Steinberg, T., Matiasek, K., Greene, C. E., Hartmann, K. & Fischer, A. (2007). Use of anti-coronavirus antibody testing of cerebrospinal fluid for diagnosis of feline infectious peritonitis involving the central nervous system in cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 230, 199-205. doi:10.2460/javma.230.2.199
- Bright, K. R., Sicairos-Ruelas, E. E., Gundy, P. M. & Gerba, C. P. (2009). Assessment of the Antiviral Properties of Zeolites Containing Metal Ions, *Food and Environmental Virology*, 1, 37–41. doi:10.1007/s12560-008-9006-1
- Brown, M. A., Troyer, J. L., Pecon-Slattery, J., Roelke, M. E. & O'Brien, S. J. (2009). Genetics and Pathogenesis of Feline Infectious Peritonitis Vírus. *Emerging Infectious Diseases*, 15 (9), 1445-1452. doi: 10.3201/eid1509.081573
- Cannon, M. J., Silkstone, M. A. & Kipar, A. M. (2004). Case report: Cutaneous lesions associated with coronavirus-induced vasculitis in a cat with feline infectious peritonitis and concurrent feline immunodeficiency virus infection. *Journal of Feline Medicine & Surgery*, 7, 233-236. doi:10.1016/j.jfms.2004.12.001
- Can-Sahna, K., Soydal Ataseven, V., Pinar, D. & Oğuzoğlu, T. C. (2007). The detection of feline coronaviruses in blood samples from cats by mRNA RT-PCR. *Journal of Feline Medicine & Surgery*, 9, 369-72. doi:10.1016/j.jfms.2007.03.002
- Cave, T. A., Golder, M. C., Simpson, J. & Addie, D. D. (2004). Risk factors for feline coronavirus seropositivity in cats relinquished to a UK rescue charity. *Journal of Feline Medicine & Surgery*, 6, 53–58. doi:10.1016/j.jfms.2004.01.003
- Ceciliani, F., Grossi, C., Giordano, A., Pocacqua, V. & Paltrinieri, S. (2004). Decreased sialylation of the acute phase protein alpha1-acid glycoprotein in feline infectious peritonitis (FIP). *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 99, 229-36. doi:10.1016/j.vetimm.2004.02.003
- Chang, H.-W., de Groot, R.J., Egberink, H. F. & Rottier, P. J. M. (2010). Feline infectious peritonitis: insights into feline coronavirus pathobiogenesis and epidemiology based on genetic analysis of the viral 3c gene. *Journal of General Virology*, 91, 415–420. doi:10.1099/vir.0.016485-0
- Chen, G.-Y., Osada, H., Santamaria-Babi, L. F. & Kannagi, R. (2006). Interaction of GATA-3/T-bet transcription factors regulates expression of sialyl Lewis X homing receptors on Th1/Th2 lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(45), 16894-16899. doi: 10.1073/pnas.0607926103.
- Companion Animal Diagnostics – University of Glasgow (2008). *Interpretation of Feline Coronavirus Antibody Test results*. Disponível em www.glasgow.ac.uk/vet/cad
- Colitz, C. M. H. (2005). Feline Uveitis: Diagnosis and Treatment. *Clinical Techniques in Small Animal Practice*, 20, 117-120. doi:10.1053/j.ctsap.2004.12.016
- Cornelissen, E., Dewerchin, H., Van Hamme, E. & Nauwynck, H. (2007). Absence of surface expression of feline infectious peritonitis virus (FIPV) antigens on infected cells iso-

- lated from cats with FIP. *Veterinary Microbiology*, 121(1-2), 131-137. doi: 10.1016/j.vetmic.2006.11.026.
- Cornelissen, E., Dewerchin, H. L., Van Hamme, E. & Nauwynck, H. J. (2009). Absence of antibody-dependent, complement-mediated lysis of feline infectious peritonitis virus-infected cells. *Virus Research* 144 , 285–289. doi:10.1016/j.virusres.2009.03.017
- Day, M. J., Horzinek, M. C. & Schultz, R. D. (2010). Guidelines for the vaccination of dogs and cats. *Journal of Small Animal Practice*, 51 (6), 338-356. doi:10.1111/j.1748-5827.2010.00959.x
- De Groot, R. J., Ter Haar, R. J., Horzinek, M. C. & Van Der Zeijst, B. A. M. (1987). Intracellular RNAs of the Feline Infectious Peritonitis Coronavirus Strain 79-1146. *Journal of General Virology*, 68(4), 995-1002. doi: 10.1099/0022-1317-68-4-995.
- De Groot-Mijnes, J. D., van Dun, J. M., van der Most, R. G. & de Groot, R. J. (2005). Natural history of a recurrent feline coronavirus infection and the role of cellular immunity in survival and disease. *Journal of Virology*, 79: 1036-44. doi:10.1128/JVI.79.2.1036-1044.2005
- De Vries, A. A. F., Horzinek, M. C., Rottier, P. J. M. & de Groot, R. J. (1997). The Genome Organization of the Nidovirales: Similarities and Differences between Arteri-, Toro-, and Coronaviruses. *Seminars in Virology*, 8, 33–47. doi:10.1006/smvy.1997.0104
- Dean G. A., Olivry, T., Stanton, C. & Pedersen, N. C. (2003). In vivo cytokine response to experimental feline infectious peritonitis virus infection. *Veterinary Microbiology*, 97, 1-12. doi:10.1016/j.vetmic.2003.08.010
- Decroly, E., Imbert, I., Coutard, B., Bouvet, M., Selisko, B., Alvarez, K., Gorbalenya, A. E., Snijder, E. J. & Canard, B. (2008). Coronavirus Nonstructural Protein 16 Is a Cap-0 Binding Enzyme Possessing (Nucleoside-2' O)-Methyltransferase Activity. *Journal of Virology*, 82 (16), 8071–8084. doi:10.1128/JVI.00407-08
- Deepak, S. A., Kottapalli, K. R., Rakwal, R., Oros, G., Rangappa, K. S., Iwahashi, H., Masuo, Y. & Agrawal, G. K. (2007). Real-Time PCR: Revolutionizing Detection and Expression Analysis of Genes. *Current Genomics*, 8, 234-251. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2430684/>
- Dewerchin, H. L., Cornelissen, E. & Nauwynck, H. J. (2005). Replication of feline coronaviruses in peripheral blood monocytes. *Archives of Virology*, 150, 2483–2500. doi: 10.1007/s00705-005-0598-6
- Dewerchin, H. L., Cornelissen, E. & Nauwynck, H. J. (2006). Feline infectious peritonitis virus-infected monocytes internalize viral membrane-bound proteins upon antibody addition. *Journal of General Virology*, 87, 1685–1690. doi: 10.1099/vir.0.81692-0
- Dewerchin, H. L., Cornelissen, E., Van Hamme, E., Smits, K., Verhasselt, B. & Nauwynck, H. J. (2008). Surface-expressed viral proteins in feline infectious peritonitis virus-infected monocytes are internalized through a clathrin- and caveolae-independent pathway. *Journal of General Virology*, 89, 2731–2740. doi: 10.1099/vir.0.2008/002212-0
- Diaz, J. V. & Poma, R. (2009). Diagnosis and clinical signs of feline infectious peritonitis in the central nervous system. *The Canadian Veterinary Journal*, 50, 1091-1093. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2748294/?tool=pubmed>
- Diederich, S., Thielm L. & Maisnerm A. (2008). Role of endocytosis and cathepsin-mediated activation in Nipah virus entry. *Virology*, 375, 391–400. doi:10.1016/j.virol.2008.02.019

- Duarte, A., Veiga, I. & Tavares, L. (2009). Genetic diversity and phylogenetic analysis of Feline Coronavirus sequences from Portugal. *Veterinary Microbiology*, 138, pp.163–168. doi:10.1016/j.vetmic.2009.03.009
- Duarte, A., Pereira da Fonseca, I., Almeida, V., Madeira de Carvalho, L., Meireles, J., Fazendeiro, M., *et al.* (2010). Survey of infectious disease agents in stray cats in the metropolitan area of Lisbon, Portugal. *Journal of Feline Medicine & Surgery*, 12 (6), 2010, 441-446 doi:10.1016/j.jfms.2009.11.003
- Dye, C. & Siddell, S. G. (2005). Genomic RNA sequence of Feline coronavirus strain FIPV WSU-79/1146, *Journal of General Virology*, 86, 2249–2253. doi: 10.1099/vir.0.80985-0
- Dye, C., Temperton, N. & Siddell, S. G. (2007). Type I feline coronavirus spike glycoprotein fails to recognize aminopeptidase N as a functional receptor on feline cell lines, *Journal of General Virology*, 88, 1753–1760. doi: 10.1099/vir.0.82666-0
- Dye, C. & Siddell, S. G. (2007). Genomic RNA sequence of feline coronavirus strain FCoV C1Je. *Journal of Feline Medicine & Surgery*, 9 (3), 202–213. doi:10.1016/j.jfms.2006.12.002
- Dye, C., Helps, C. R. & Siddell, S. G. (2008). Evaluation of real-time RT-PCR for the quantification of FCoV shedding in the faeces of domestic cats, *Journal of Feline Medicine & Surgery*, 10, 167-174. doi:10.1016/j.jfms.2007.10.010.
- Foley, J. E., Rand, C. & Leutenegger, C. (2003). Inflammation and changes in cytokine levels in neurological feline infectious peritonitis. *Journal of Feline Medicine & Surgery*, 5, 313–322. doi:10.1016/S1098-612X(03)00048-2
- Gelain, M. E., Meli, M. & Paltrinieri, S. (2006). Whole blood cytokine profiles in cats infected by feline coronavirus and healthy non-FCoV infected specific pathogen-free cats. *Journal of Feline Medicine & Surgery*, 8, 389-399. doi:10.1016/j.jfms.2006.05.002
- German, A. C., Helps, C. R. & Harbour, D. A. (2004). FIP: a novel approach to vaccination. *Journal of Feline Medicine & Surgery*, 6, 119–124. doi:10.1016/j.jfms.2003.08.010
- Giordano, A., Spagnolo, V., Colombo, A. & Paltrinieri, S. (2004). Changes in some acute phase protein and immunoglobulin concentrations in cats affected by feline infectious peritonitis or exposed to feline coronavirus infection. *Veterinary Journal*, 167, 38-44. doi:10.1016/S1090-0233(03)00055-8
- Giordano, A. & Paltrinieri, S. (2009). Interferon-gamma in the serum and effusions of cats with feline coronavirus infection. *Veterinary Journal*, 180, 396-398. doi:10.1016/j.tvjl.2008.02.028
- Glansbeek, H. L., Haagmans, B. L., de Lintelo, E. G., Egberink, H. F., Duquesne, V., Aubert, A., Horzinek, M. C. & Rottier, P. J. M. (2002). Adverse effects of feline IL-12 during DNA vaccination against feline infectious peritonitis virus. *Journal of General Virology*, 83, 1-10. Disponível em: <http://vir.sgmjournals.org/cgi/content/full/83/1/1>
- Gonon, V., Duquesne, V., Klonjowski, B., Monteil, M., Aubert, A. & Eloit, M. (1999). Clearance of infection in cats naturally infected with feline coronaviruses is associated with an anti-S glycoprotein antibody response. *Journal of General Virology*, 80, 2315-7. Disponível em: <http://jgv.sgmjournals.org/cgi/content/full/80/9/2315>
- Gough, A. (2007) *Diferencial Diagnosis in Small Animal Medicine*. (333). Oxford, United Kingdom: Blackwell Publishing.

- Gruffydd-Jones, T. (2009). Practical tips for diagnosing FIP in *Proceedings of the 34th World Small Animal Veterinary Congress 2009 - São Paulo, Brazil*. Disponível em: www.ivis.org/proceedings/wsava/2009
- Gundy, P. M., Gerba, C. P. & Pepper, I. L. (2009) Survival of Coronaviruses in Water and Wastewater. *Food and Environmental Virology*, 1, 10–14. doi:10.1007/s12560-008-9001-6
- Haijema, B. J., Volders, H. & Rottier, P. J. (2004). Live, attenuated coronavirus vaccines through the directed deletion of group-specific genes provide protection against feline infectious peritonitis. *Journal of Virology*, 78, 3863-71. doi:10.1128/JVI.78.8.3863–3871.2004
- Hartmann, K., Binder, C., Hirschberger, J., Cole, D., Reinacher, M., Schroo, S., *et al* (2003). Comparison of different tests to diagnose feline infectious peritonitis. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 17, 781-790.
- Hartmann, K. (2005). Feline infectious peritonitis. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 35(1), 39-79. doi: 10.1016/j.cvsm.2004.10.011.
- Hartmann, K. (2006). Antiviral and Immunomodulatory Chemotherapy in Greene CE (Ed), *Infectious Diseases of the Dog and Cat*, (3rd). (10-24). St Louis, Missouri: Saunders.
- Hartmann, K. & Ritz, S. (2008). Treatment of cats with feline infectious peritonitis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 123,172–175. doi:10.1016/j.vetimm.2008.01.026
- Hebben, M., Duquesne, V., Cronier, J., Rossi, B. & Aubert, A. (2004). Modified vaccinia virus Ankara as a vaccine against feline coronavirus: immunogenicity and efficacy. *Journal of Feline Medicine & Surgery*, 6, 111-8. doi:10.1016/j.jfms.2003.12.011
- Herrewegh, A. A. P. M., de Groot, R. J., Cepica, A., Egberink, H. F., Horzinek, M. C. & Rottier, P. J. M. (1995). Detection of Feline Coronavirus RNA in Feces, Tissues and Body Fluids of Naturally Infected Cats in Reverse Transcriptase PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 684-689. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC228014/>
- Herrewegh, A. A. P. M., Smeenk, I., Horzinek, M. C., Rottier, P. J. M. & de Groot, R. J. (1998). Feline Coronavirus Type II Strains 79-1683 and 79-1146 Originate from a Double Recombination between Feline Coronavirus Type I and Canine Coronavirus. *Journal of Virology*, 72 (5), 4508-4514. Disponível em: <http://jvi.asm.org/cgi/content/short/72/5/4508>
- Hirsh, D. C., MacLachlan, N. J. & Walker, R. L. (2004). *Veterinary Microbiology* (2nd edition). Oxford: Blackwell Publishing. 383, 389-390.
- Hohdatsu, T., Izumiya, Y., Yokoyama, Y., Kida, K. & Koyama, H. (1998). Differences in virus receptor for type I and type II feline infectious peritonitis virus. *Archives of Virology*, 143, 839–850. doi:10.1007/s007050050336
- Hohdatsu, T., Yamato, H., Ohkawa, T., Kaneko, M., Motokawa, K., Kusuhara, H., *et al*. (2003). Vaccine efficacy of a cell lysate with recombinant baculovirus-expressed feline infectious peritonitis (FIP) virus nucleocapsid protein against progression of FIP. *Veterinary Microbiology*, 2, 31-44. doi:10.1016/j.vetmic.2003.09.016
- Holst, B. S., Englund, L., Palacio, S., Renström, L. & Berndtsson, L. T. (2006). Prevalence of antibodies against feline coronavirus and *Chlamydophila felis* in Swedish cats. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 8, 207-211. doi:10.1016/j.jfms.2005.12.004

- Horzinek, M. C. (2004). The bright future of coronavirology. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 6, 49–51. doi:10.1016/j.jfms.2004.01.004
- Huang, I. C., Bosch, B.J., Li, F., Li, W., Lee, K.H., Ghiran, S., Vasilieva, N., Dermody, T.S., Harrison, S.C., Dormitzer, P.R., Farzan, M., Rottier, P.J. & Choe, H. (2005). SARS coronavirus, but not human coronavirus NL63, utilizes cathepsin L to infect ACE2-expressing cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 10, 3198–3203. doi:10.1074/jbc.M508381200
- Huisman, W., Martina, B. E., Rimmelzwaan, G. F., Gruters, R. A. & Osterhaus, A. D. (2009). Vaccine-induced enhancement of viral infections. *Vaccine*, 27, 505–512. doi:10.1016/j.vaccine.2008.10.087
- Hye-Young, K., Hyun-Soo, S., Hyun, P., Youn-Chul, K., Yong Gab, Y., Sun, P., Ho-Joon, S. & Kyongmin, Kim. (2008). In vitro inhibition of coronavirus replications by the traditionally used medicinal herbal extracts, Cimicifuga rhizoma, Meliae cortex, Coptidis rhizoma, and Phellodendron cortex. *Journal of Clinical Virology*, 41, 122–128. doi:10.1016/j.jcv.2007.10.011
- IHC World: Life Science Information Network*. Acedido em Out. 27, 2010, disponível em: <http://www.ihcworld.com/>
- Ishida, T., Shibana, A., Tanaka, S., Uchida, K. & Mochizuki, M. (2004). Use of recombinant feline interferon and glucocorticoid in the treatment of feline infectious peritonitis. *Journal of Feline Medicine & Surgery*, 6, 107-9. doi:10.1016/j.jfms.2003.08.011
- Kennedy, M. A., Abd-Eldaim, M., Zika, S. E., Mankin, J. M. & Kania, S. A. (2008). Evaluation of antibodies against feline coronavirus 7b protein for diagnosis of feline infectious peritonitis in cats. *American Journal of Veterinary Research*, 69, 1179-82. doi:10.2460/ajvr.69.9.1179
- Kennedy, M. A. (2009). An update on feline infectious peritonitis. Acedido a Fev. 5, 2010 em <http://license.icopyright.net/user/viewFreeUse.act?fuid=NjkONzMyM...>
- Kent, M. (2009). The cat with neurological manifestations of systemic disease: Key conditions impacting on the CNS. *Journal of Feline Medicine & Surgery*, 11, 395-407. doi:10.1016/j.jfms.2009.03.007
- Kienle, R. D. & Thomas, W. P. (2002). Abdominal Fluid, Lymph nodes, masses, peritoneal cavity and great vessel thrombosis. In Nyland, T. G. & Mattoon, J. S. (Eds.), *Small Animal Diagnostic Ultrasound (2nd Ed.)*. (p.412-414). Philadelphia, USA: Saunders.
- Kipar, A., Bellmann, S., Kremendahl, J., Kohler, K. & Reinacher, M., (1998). Cellular composition, coronavirus antigen expression and production of specific antibodies in lesions in feline infectious peritonitis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 65, 243–257. doi:10.1016/S0165-2427(98)00158-5
- Kipar, A., Köhler, K., Leukert, W. & Reinacher, M. (2001). A comparison of lymphatic tissues from cats with spontaneous feline infectious peritonitis (FIP), cats with FIP virus infection but no FIP, and cats with no infection. *Journal of Comparative Pathology*, 125, 182-191. doi:10.1053/jcpa.2001.0501
- Kipar, A., May, H., Menger, S., Weber, M., Leukert, W. & Reinacher, M. (2005) Morphologic features and development of granulomatous vasculitis in feline infectious peritonitis. *Veterinary Pathology*, 42 (3), 321-30. doi: 10.1354/vp.42-3-321

- Kipar, A., Baptiste, K., Barth, A. & Reinacher, M. (2006a). Natural FCoV infection: cats with FIP exhibit significantly higher viral loads than healthy infected cats. *Journal of Feline Medicine & Surgery*, 8, 69-72. doi:10.1016/j.jfms.2005.07.002
- Kipar, A., Meli, M. L., Failing, K., Euler T, Gomes-Keller M. A., Schwartz, D., *et al.* (2006b). Natural feline coronavirus infection: differences in cytokine patterns in association with the outcome of infection. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 112, 141-55. doi:10.1016/j.vetimm.2006.02.004
- Kiss, I., Poland, A. M. & Pedersen, N. C. (2004). Disease outcome and cytokine responses in cats immunized with an avirulent feline infectious peritonitis virus (FIPV)-UCD1 and challenge-exposed with virulent FIPV-UCD8. , *Journal of Feline Medicine & Surgery*, 6, 89-97. doi:10.1016/j.jfms.2003.08.009
- Knife, D. M., Griffin, D. E., Lamb, R. A., Straus, S. E., Howley, P. M., Martin, M. A., *et al.* (2007) *Virology*. (5th edition). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins
- Kummrow, M., Meli, M. L., Haessig, M., Goenczi, E., Poland, A., Pedersen, N. C., *et al.* (2005). Feline Coronavirus Serotypes 1 and 2: Seroprevalence and Association with Disease in Switzerland. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 12(10), 1209-1215. doi: 10.1128/CDLI.12.10.1209-1215.2005.
- Legendre, A. M. & Bartges, J. W. (2009). Effect of Polyprenyl Immunostimulant on the survival times of three cats with the dry form of feline infectious peritonitis. *Journal of Feline Medicine & Surgery*, 11, 624-626. doi:10.1016/j.jfms.2008.12.002
- Lewis, K. M. & O'Brien, R. T. (2010). Abdominal Ultrasonographic Findings Associated With Feline Infectious Peritonitis: A Retrospective Review of 16 Cases. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 46 (3), 152-160. Disponível em: <http://www.jaaha.org/cgi/content/full/46/3/152>
- Li-En, H., Chao-Nan, L., Bi-Ling, S., Tong-Rong, J., Chi-Min, C., Ching-Ho, W., Dah-Sheng, L., Chung-Tien, L. & Ling-Ling, C. (2010). Synergistic antiviral effect of Galanthus nivalis agglutinin and nelfinavir against feline coronavirus. *Antiviral Research*, 88, 25–30. doi:10.1016/j.antiviral.2010.06.010
- Lin, C., Su, B., Wang, C., Hsieh, M., Chueh, T., & Chueh, L. (2008). Genetic diversity and correlation with feline infectious peritonitis of feline coronavirus type I and II: A 5-year study in Taiwan. *Veterinary Microbiology*, 136, 233-239. doi: 10.1016/j.vetmic.2008.11.010.
- Lin, C.-N., Su, B.-L., Huang, H. P., Lee, J.-J., Hsieh, M.-W., Chueh, L.-L. (2009). Field strain feline coronaviruses with small deletions in ORF7b associated with both enteric infection and feline infectious peritonitis. *Journal of Feline Medicine & Surgery*, 11, 413-419. doi:10.1016/j.jfms.2008.09.004
- Luria, B. J., Levy, J. K., Lappin, M. R., Breitschwerdt, E. B., Legendre, A. M., Hernandez, J. A., *et al.* (2004) Prevalence of infectious diseases in feral cats in Northern Florida. *Journal of Feline Medicine & Surgery*, 6: 287-96. doi:10.1016/j.jfms.2003.11.005
- Manolaridis, I., Wojdyla, J. A., Panjekar, S., Snijder, E. J., Gorbalenya, A. E., Berglind, H., Nordlund, P., Coutard, B. & Tucker, P. A. (2009). Structure of the C-terminal domain of nsp4 from feline coronavirus. *Acta Crystallography.*, 65, 839–846. doi:10.1107/S0907444909018253
- Marinaro, M, Mari, V., Bellacicco A. L., Tarsitano, E., Elia, G., Losurdo, M., Rezza, G., Buonavoglia, C. & Decaro, N. (2010). Prolonged depletion of circulating CD4+ T lympho-

cytes and acute monocytosis after pantropic canine coronavirus infection in dogs, *Virus Research*, 152, 73–78. doi:10.1016/j.virusres.2010.06.006

- Martin, M. (2007). *Small animal ECGs: an introductory guide*. (2nd ed.). (pp. 51-53). Oxford, United Kingdom: Blackwell Publishing.
- Mattoon, J. S. & Nyland, T. G. (2002). Abdominal Fluid, Lymph nodes, masses, peritoneal cavity and great vessel thrombosis. In Nyland, T. G. & Mattoon, J. S. (Eds.), *Small Animal Diagnostic Ultrasound* (2nd Ed.). (p.82). Philadelphia, USA: Saunders.
- Maxie, M. G. (Ed.). (2007). *Pathology of Domestic Animals (Volume 2)*. (5th ed.). Philadelphia, USA: Saunders Elsevier. 290-293.
- Meli, M., Kipar, A., Müller, C., Jenal, K., Gönczi, E., Borel, N., Gunn-Moore, D., Chalmers, S., Lin, F., Reinacher, M. & Lutz, H. (2004). High viral loads despite absence of clinical and pathological findings in cats experimentally infected with feline coronavirus (FCoV) type I and in naturally FCoV-infected cats. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 6, 69-81. doi:10.1016/j.jfms.2003.08.007
- Muirden, A. (2002). Prevalence of feline leukaemia virus and antibodies to feline immunodeficiency virus and feline coronavirus in stray cats sent to an RSPCA hospital. *Veterinary Record*, 150, 621-625. doi:10.1136/vr.150.20.621
- Murphy, F. A., Gibbs, E. P. J., Horzinek, M. C. & Studdert, M. J. (1999). *Veterinary Virology*. 3rd edition. London: Academic Press., 495-499.
- Negrin, A., Lamb, C. R., Cappello, R. & Cherubini, G. B. (2007). Results of magnetic resonance imaging in 14 cats with meningoencephalitis. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 9, 109-116. doi:10.1016/j.jfms.2006.09.001
- Norris, J. (2007). Updates in FIP: pathogenesis, diagnosis and treatment. In *Proceedings of the 32th WSAVA Congress: Sydney, Australia*. Disponível em: <http://www.ivis.org/proceedings/Wsava/2007>
- Norris, J. M., Bosward, K. L., White, J. D., Baral, R. M., Catt, M. J. & Malik, R. (2005). Clinicopathological findings associated with feline infectious peritonitis in Sydney, Australia: 42 cases (1990-2002), *Australian Veterinary Journal*, 83 (11), 666-73.
- Paltrinieri, S., Cammarata, M. P., Cammarata, G. & Comazzi, S. (1998). Some aspects of humoral and cellular immunity in naturally occurring feline infectious peritonitis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 65, 205-220. doi:10.1016/S0165-2427(98)00155-X
- Paltrinieri, S., Grieco, V., Comazzi, S. & Cammarata, P. M. (2001). Laboratory profiles in cats with different pathological and immunohistochemical findings due to feline infectious peritonitis (FIP). *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 3, 149-159. doi:10.1053/jfms.2001.0126
- Paltrinieri S, Ponti W, Comazzi S, Giordano A & Poli G (2003a). Shifts in circulating lymphocyte subsets in cats with feline infectious peritonitis (FIP): pathogenic role and diagnostic relevance. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 15, 141-148. doi:10.1016/S0165-2427(03)00156-9
- Paltrinieri, S., Cecilian, F., Gaganti, E., Sironi, G., Giordano, A. & Addie, D. (2003b). Expression patterns in feline blood and tissues of a α 1-acid glycoprotein (AGP) and of a AGP-related protein (AGPrP). *Comparative Clinical Pathology*, 12, 140-146. doi:10.1007/s00580-003-0489-8

- Paltrinieri, S., Giordano, A., Cecilian, F. & Sironi, G. (2004). Tissue distribution of feline AGP related protein (fAGPrP) in cats with feline infectious peritonitis (FIP). *Journal of Feline Medicine & Surgery*, 6, 99-105. doi:10.1016/j.jfms.2003.08.012
- Paltrinieri, S. (2007). Early Biomarkers of Inflammation in Dogs and Cats: The acute phase proteins. *Veterinary Research Communications*, 31 (Suppl. 1), 125-129. doi: 10.1007/s11259-007-0107-3
- Paltrinieri, S., Giordano, A., Tranquillo, V. & Guazzetti, S. (2007a). Critical assessment of the diagnostic value of feline α 1-acid glycoprotein for feline infectious peritonitis using the likelihood ratios approach, *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 19, 266–272. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17459855>
- Paltrinieri, S., Metzger, C., Battilani, M., Gelain, M. E. & Giordano, A. (2007b). Serum alpha1-acid glycoprotein (AGP) concentration in non-symptomatic cats with feline coronavirus (FCoV) infection. *Journal of Feline Medicine & Surgery*, 9, 271-7. doi:10.1016/j.jfms.2007.01.002
- Paltrinieri, S. (2008). The feline acute phase reaction. *The Veterinary Journal*, 177, 26–35. doi:10.1016/j.tvjl.2007.06.005
- Papasouliotis, K. (2010). In-house haematology analysers: an update. In *XXXIV Jornadas Médico-Veterinárias da AEFMV, 5-7 Novembro 2010*. Lisboa – Portugal.
- Patel, J. R. & Heldens, J. G. M. (2009). Review of companion animal viral diseases and immunoprophylaxis. *Vaccine*, 27, 491–504. doi:10.1016/j.vaccine.2008.11.027
- Pedersen, N. C., Sato, R., Foley, J. E. & Poland, A. M. (2004). Common virus infections in cats, before and after being placed in shelters, with emphasis on feline enteric coronavirus. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 6, 83-88. doi:10.1016/j.jfms.2003.08.008
- Pedersen, N. C., Allen, C. E. & Lyons, L. A. (2008). Pathogenesis of feline enteric coronavirus infection. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 10, 529-541. doi:10.1016/j.jfms.2008.02.006
- Pedersen, N. C. (2009). A review of feline infectious peritonitis:1963-2008. *Journal of Feline Medicine & Surgery*, 11, 225-258. doi:10.1016/j.jfms.2008.09.008
- Pesteanu-Somogyi, L. D., Radzai, C. & Pressler, B. M. (2006). Prevalence of feline infectious peritonitis in specific cat breeds. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 8, 1-5 doi:10.1016/j.jfms.2005.04.003
- Pratelli, A. (2008). Comparison of serologic techniques for the detection of antibodies against feline coronaviruses. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 20(1), 45-50. Disponível em: <http://jvdi.org/cgi/content/full/20/1/45>
- Quinn, P. J., Markey, B. K., Carter, M. E., Donnelly, W. J. C. & Leonard, F. C. (2002). *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*. Oxford: Blackwell Science. 413-416.
- Radford, A. (2006). Antiviral therapy in cats – what works and what Doesn't, 31st World Congress WSAVA/FECAVA/CSAVA, 347-350. Prague. Disponível em www.ivis.org
- Regan, A. D., Shraybman, R., Cohen, R. D. & Whittaker, G. R. (2008). Differential role for low pH and cathepsin-mediated cleavage of the viral spike protein during entry of serotype II feline coronaviruses. *Veterinary Microbiology*, 132, 235–248. doi:10.1016/j.vetmic.2008.05.019

- Regan, A. D., Cohen, R. D. & Whittaker, G. R. (2009). Activation of p38 MAPK by feline infectious peritonitis virus regulates pro-inflammatory cytokine production in primary blood-derived feline mononuclear cells. *Virology*, 384 (1), 135-143. doi:10.1016/j.virol.2008.11.006
- Rohrbach, B. W., Legendre, A. M., Baldwin, C. A., Lein, D. H., Reed, W. M. & Wilson, R. B. (2001). Epidemiology of feline infectious peritonitis among cats examined at veterinary medical teaching hospitals. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 218 (7), 1111-5.
- Rosado, R. C. (2009). *Rastreo Viroológico de carnívoros errantes e Caracterização genética viral*. Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade Técnica de Lisboa.
- Rossi, G. & Paltrinieri, S. (2009). Total sialic acid: An acute phase reactant in cats with a possible role in feline coronavirus infection, *The Canadian Journal of Veterinary Research*, 73, 144–150. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2666320/>
- Rota, A., Paltrinieri, S., Jussich, S., Ubertalli, G. & Appino, S. (2008). Case report: Priapism in a castrated cat associated with feline infectious peritonitis. *Journal of Feline Medicine & Surgery*, 10, 181-184. doi:10.1016/j.jfms.2007.08.006
- Rottier, P. J., Nakamura, K., Schellen, P., Volders, H. & Haijema, B. J. (2005). Acquisition of macrophage tropism during the pathogenesis of feline infectious peritonitis is determined by mutations in the feline coronavirus spike protein. *Journal of Virology*, 79, 14122-30. doi:10.1128/JVI.79.22.14122-14130.2005
- Sharif, S., Arshad, S. S., Hair-Bejo, M., Omar, A. R., Zeenathul, N. A. & Hafidz MA (2009). Prevalence of feline coronavirus in two cat populations in Malaysia. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 11, 1031-1034. doi:10.1016/j.jfms.2009.08.005
- Sharif, S., Arshad, S. S., Hair-Bejo, M., Omar, A. R., Zeenathul, N. A. & Alazawy, A. (2010). Diagnostic Methods for Feline Coronavirus: A Review. *Veterinary Medicine International*. doi:10.4061/2010/809480
- Shiba, N., Maeda, K., Kato, H., Mochizuki, M. & Iwata, H. (2007). Differentiation of feline coronavirus type I and II infections by virus neutralization test. *Veterinary Microbiology*, 124, 348–352. doi:10.1016/j.vetmic.2007.04.031
- Sieczkarski, S. B. & Whittaker, G. R. (2002). Dissecting virus entry via endocytosis. *Journal of General Virology*, 83, 1535–1545. Disponível em: <http://vir.sgmjournals.org/cgi/content/short/83/7/1535>
- Simons, A. F., Vennema, H., Rofina, J. E., Pol, J. M., Horzinek, M. C., Rottier P. J. M., Egberink H. F. (2005). A mRNA PCR for the diagnosis of feline infectious peritonitis. *Journal of Virological Methods*, 124, 111-116. doi:10.1016/j.jviromet.2004.11.012
- Singh, M., Foster, D. J., Child, G. & Lamb, W. A. (2005). Inflammatory cerebrospinal fluid analysis in cats: clinical diagnosis and outcome. *Journal of Feline Medicine & Surgery*, 7, 77-93. doi:10.1016/j.jfms.2004.07.001
- Schorr-Evans, E. M., Poland, A., Johnson, W. E. & Pedersen, N. C. (2003). An epizootic of highly virulent feline calicivirus disease in a hospital setting in New England, *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 5, 217–226. doi:10.1016/S1098-612X(03)00008-1

- Stott, J. L. (1999). Coronaviridae. In Hirsh DC & Zee YC (Eds.), *Microbiologia Veterinária*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 389, 394-395.
- Takano, T., Hohdatsu, T., Toda, A., Tanabe, M. & Koyama, H. (2007a). TNF-alpha, produced by feline infectious peritonitis virus (FIPV)-infected macrophages, upregulates expression of type II FIPV receptor feline aminopeptidase N in feline macrophages. *Virology*, 364, 64-72. doi:10.1016/j.virol.2007.02.006
- Takano, T., Hohdatsu, T., Hashida, Y., Kaneko, Y., Tanabe, M. & Koyama, H. (2007b). A 'possible' involvement of TNF-alpha in apoptosis induction in peripheral blood lymphocytes of cats with feline infectious peritonitis. *Veterinary Microbiology*, 119, 121-131. doi:10.1016/j.vetmic.2006.08.033
- Takano, T., Y. Katada, S. Moritoh, M. Ogasawara, K. Satoh, R. Satoh, M. Tanabe & T. Hohdatsu (2008). Analysis of the mechanism of antibodydependent enhancement of feline infectious peritonitis virus infection: aminopeptidase N is not important and a process of acidification of the endosome is necessary. *Journal of General Virology*, 89, 1025–1029. Disponível em: <http://vir.sgmjournals.org/cgi/content/full/89/4/1025>
- Takano, T., Azuma, N., Hashida, Y., Satoh, R. & Hohdatsu, T. (2009). B-cell activation in cats with feline infectious peritonitis (FIP) by FIP-virus-induced B-cell differentiation/survival factors. *Archives of Virology*, 154, 27-35. doi:10.1007/s00705-008-0265-9
- Tekes, G., Hofmann-Lehmann, R., Stallkamp, I., Thiel, V. & Thiel, H.-J. (2008). Genome Organization and Reverse Genetic Analysis of a Type I Feline Coronavirus. *Journal of Virology*, 82 (4). 1851–1859. doi:10.1128/JVI.02339-07
- Thorp, E. B. & Gallagher, T. M. (2005). Diversity of Coronavirus Spikes: Relationship to Pathogen Entry and Dissemination in Wolfgang Fischer (Eds.), *Viral Membrane Proteins: Structure, Function, and Drug Design*. New York: Kluwer Academic / Plenum Publishers, 49-63.
- Timmann, D., Cizinauskas, S., Tomek, A., Doherr, M., Vandeveld, M. & Jaggy, A. (2008). Retrospective analysis of seizures associated with feline infectious peritonitis in cats. *Journal of Feline Medicine & Surgery*, 10, 9-15. doi:10.1016/j.jfms.2007.06.004
- Tusell, S. M., Schittone, S. A. & Holmes, K. V. (2007). Mutational analysis of aminopeptidase N, a receptor for several group 1 coronaviruses, identifies key determinants of viral host range. *Journal of Virology*, 81 (3), 1261-1273. doi:10.1128/JVI.01510-06
- Van Hamme, E., Dewerchin, H. L., Cornelissen, E. & Nauwynck, H. J. (2007). Attachment and internalization of feline infectious peritonitis virus in feline blood monocytes and Crandell feline kidney cells. *Journal of General Virology*, 88, 2527–2532. doi 10.1099/vir.0.82991-0
- Van Hamme, E., Dewerchin, H. L., Cornelissen, E., Verhasselt, B. & Nauwynck, H. J. (2008). Clathrin- and caveolae-independent entry of feline infectious peritonitis virus in monocytes depends on Dynamin. *Journal of General Virology*, 89, 2147–2156. doi 10.1099/vir.0.2008/001602
- Vennema, H., Poland, A., Foley, J. & Pedersen, N.C. (1998). Feline infectious peritonitis viruses arise by mutation from endemic feline enteric coronaviruses. *Virology* 243, 150–157. doi:10.1006/viro.1998.9045
- Vigani, A., Giordano, A. & Travetti, O. (2009). Uncommon mediastinal cyst-like manifestation of feline infectious peritonitis, *Veterinary Record*, 165, 239-241. doi:10.1136/vr.165.8.239

ANEXO I – BREVE DESCRIÇÃO DAS ACTIVIDADES DE ESTÁGIO

O Estágio Curricular foi realizado no Hospital Escolar e nos Laboratórios de Microbiologia e Virologia e de Biologia Molecular da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa, sob orientação do Professor Doutor Virgílio da Silva Almeida e co-orientação da Dr.^a Joana Pontes.

O estágio no Hospital Escolar teve início no dia 1 de Março de 2010 e terminou a 27 de Agosto de 2010, tendo o trabalho laboratorial se prolongado até Novembro de 2010, representando uma carga horária total de 1360 horas.

Durante a realização do Estágio Curricular, tive oportunidade colaborar nos diversos Serviços integrados no Hospital Escolar, nomeadamente nos Serviços de Medicina Interna (528 h), no Serviço de Cirurgia (168 h) e no Serviço de Internamento (624 h) (Gráfico 6).

No Serviço de Medicina Interna iniciei as consultas pela recolha da anamnese e realização do exame físico com posterior discussão com o Médico Veterinário Assistente sobre o diagnóstico diferencial, exames complementares a realizar e tratamento a instituir.

Também acompanhei as seguintes Consultas de Referência: Cardiologia, Ortopedia, Neurologia, Oftalmologia e Dermatologia.

Excluindo as Consultas de Primovacinação e Vacinação, observaram-se com maior frequência casos de neoplasias, insuficiência renal, leishmaniose, parasitoses transmitidas por ixodídeos, otites e dermatites. Foram também observados alguns casos raros como Hiperaldosteronismo em Gato, Meningoarterite responsiva a corticosteróides em Cachorro, Tromboembolismo aórtico em Gato, Síndrome da *Sella Vazia* em Cão.

No Serviço de Cirurgia competiu-me auxiliar o Médico Veterinário Cirurgião nas seguintes tarefas: recepção do animal, preparação do animal para a cirurgia, monitorização da anestesia, auxílio da cirurgia propriamente dita e cuidados pós-operatórios.

A participação em Consultas de Seguimento Pós-Operatório consistiu na retirada de pontos de sutura, aplicação de vários tipos de pensos e fisioterapia.

Assisti vários tipos de cirurgias de tecidos moles, ortopedia e oftalmologia.

As cirurgias que mais assisti foram orquiectomias electivas em gatos, ovariohisterectomias electivas, mastectomias secundárias a neoplasias mamárias, em cadelas e gatas, exérese de nódulos variados e destartarizações com extracção dentária. Numa frequência menor, assisti na Ortopedia à resolução de ruptura de ligamento cruzado cranial em Cão através da técnica de avanço da tuberosidade tibial (TTA), osteotomia tripla pélvica e recessão da cabeça do fémur para correcção de displasia da anca, e osteossíntese do fémur.

Relativamente à Cirurgia de Tecidos Moles acompanhei a ablação total do conduto auditivo, esplenectomia, laparotomia, gastrotomia ou enterotomia para remoção de corpos estranhos, gastropéxia, herniorrafia perineal, biópsias várias (tecidos moles e osso), cistorrafia e cesareana. Mais especificamente na área da cirurgia oftalmológica assistiu-se à enucleação do globo ocular, exérese de nódulo palpebral e sutura da córnea por ulceração da mesma e prolapso da íris.

O Serviço de Internamento foi realizado em turnos de 12 e de 24 horas. As tarefas realizadas nesse período consistiam no maneio dos animais, desde a monitorização à preparação e administração de medicação, alimentação, cuidados de higiene e ao exercício/passeio no exterior. Realizei ainda tarefas como a cateterização (para colheita de sangue para análise e/ou fluidoterapia), algaliação, lavagem vesical, lavagem de feridas, enemas, manutenção de animais em câmara de oxigénio, realização de pensos, curvas de glicémia, monitorização de transfusão sanguínea, entre outras.

No Serviço de Imagiologia participei em diversos meios de diagnóstico imagiológico: radiologia, tomografia axial computadorizada e ecografia.

Na Radiologia acompanhei os casos iniciados na consulta geral, tendo praticado o posicionamento do animal, o funcionamento do aparelho e a interpretação da imagem.

Treinei o posicionamento do animal e a monitorização anestésica durante a execução de Tomografias Axiais Computorizadas.

Assisti inúmeras Ecografias abdominais com o acompanhamento da Dr.^a Joana Pontes e Ecocardiografias sob a orientação do Dr. Nuno Félix, tendo praticado a colocação e a movimentação da sonda no paciente. Observei os seguintes procedimentos ecoguiados: punções aspirativas (baço, fígado, rim e linfonodos), abdominocentese, cistocentese e pericardiocentese.

No Serviço de Imagiologia assisti ainda à realização de duas videoscopias, uma vaginoscopia e uma urografia de excreção.

Ao longo de todo o tempo de estágio houve oportunidade de participação directa em actividades de triagem hospitalar, preparação e administração de fármacos, recolha, preparação e envio de amostras para análise laboratorial ou observação local ao microscópio, realização de testes rápidos de diagnóstico, recepção e maneio de urgências, entre outras.

Adicionalmente, participei em reuniões de carácter didáctico sobre temas na Área Científica da Clínica com a minha Co-Orientadora Dr.^a Joana Pontes, bem como à discussão de Casos Clínicos com a participação do Prof. Dr. José Henrique Duarte Correia. Destaco um Workshop de Dermatologia organizado pela Dr.^a Ana Mafalda Lourenço sob o tema “Otites”

e um Workshop de Cirurgia, em que treinei procedimentos cirúrgicos em cadáveres, organizado pela Dr.^a Ana Murta.

O trabalho laboratorial foi realizado nos Laboratórios de Virologia e Microbiologia e de Biologia Molecular da FMV (40 h). Durante este período auxiliei a Prof. Dra. Ana Duarte na realização de vários procedimentos necessários à obtenção de resultados, nomeadamente, extracção de material genético (RNA), RT-PCR, nPCR, *Real-time* RT-PCR e ELISA Indirecta.

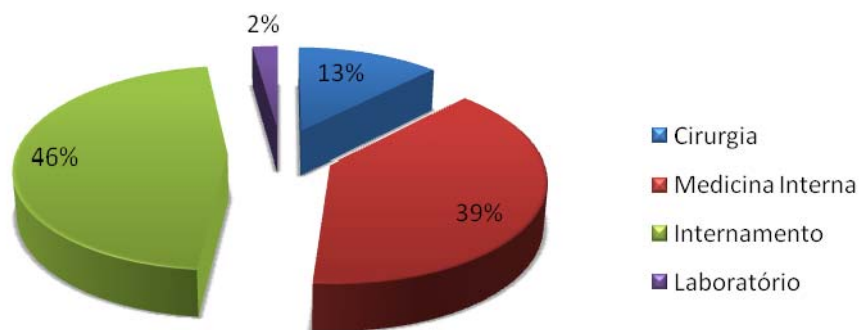
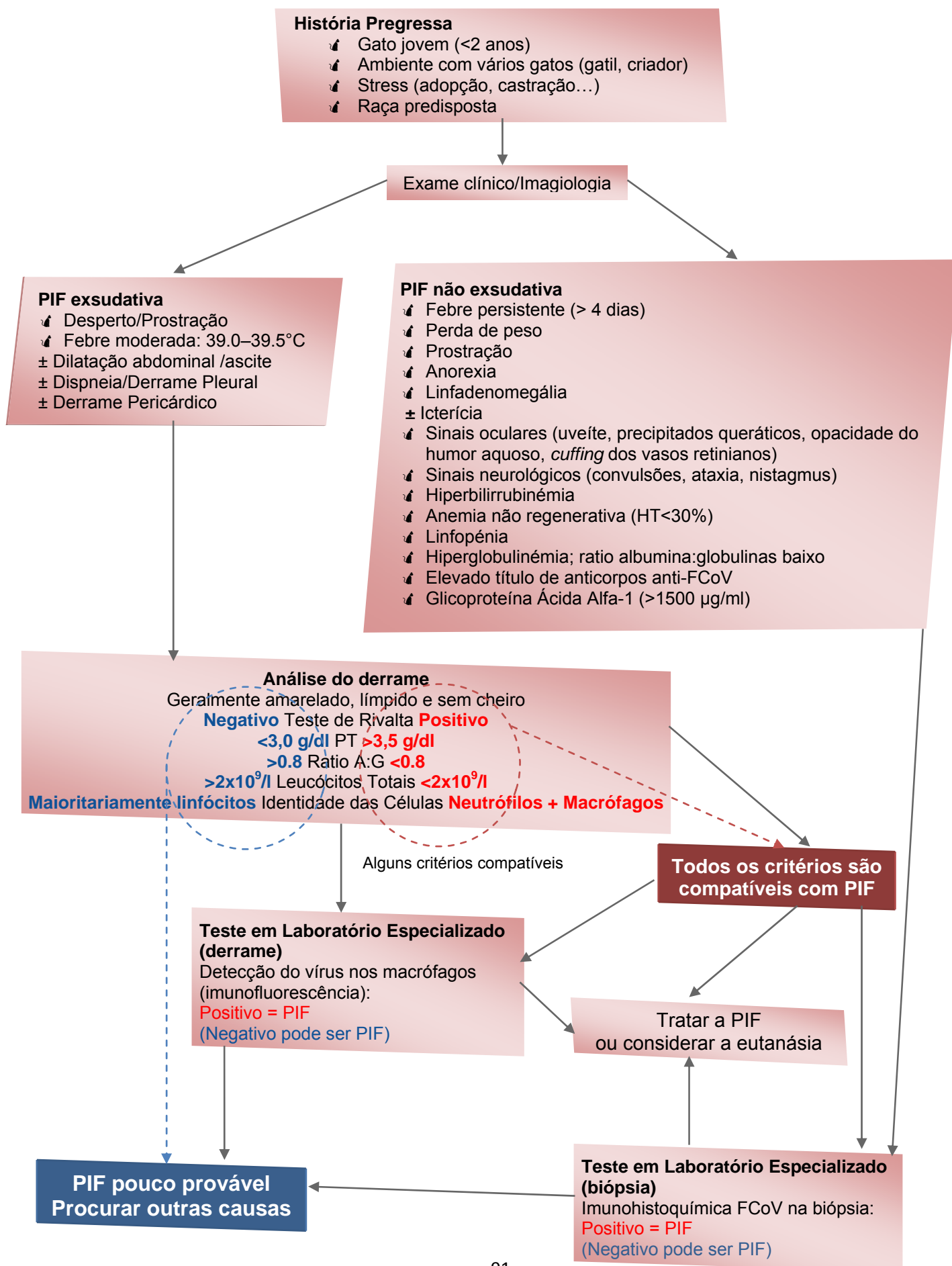


Gráfico 6: Distribuição das actividades realizadas durante o Estágio Curricular.

ANEXO II - ALGORITMO PARA O DIAGNÓSTICO DE PIF



Derrame: Será PIF?

Na presença de derrame existe uma forma fácil e eficaz de determinar se é PIF ou não: o **Teste de Rivalta**.

1. Encher um tubo de ensaio ou copo estreito de plástico ou vidro (tem que ser transparente) com 10 ml de água da torneira ou destilada à temperatura ambiente.
2. Adicionar 2-3 gotas de ácido acético a 8% (vinagre vulgar).
3. Colocar cuidadosamente algumas gotas do derrame, por exemplo com o auxílio de um conta-gotas, à superfície da solução.
4. Observar:
 - 👉 As gotas flutuam ou afundam ligeiramente parecendo uma alforreca: **resultado positivo** (Figura 24)
 - 👉 As gotas desaparecem na solução como fumo: **resultado negativo**



Figura 24: Teste de Rivalta positivo

Este teste, embora simples, tem um valor preditivo negativo de 97% e positivo de 86%, ou seja, 5 em cada 6 gatos positivos neste teste têm mesmo PIF.

Qualquer dúvida no procedimento pode ser esclarecida pela consulta da bibliografia e visualização do vídeo disponível em: <http://www.youtube.com/watch?v=XmOk2veunqA>



Referências:

Newsletter April 2010 from Companion Animal Diagnostics / University of Glasgow
Addie D.D. 2010. What is Feline Infectious Peritonitis? www.catvirus.com
Hartmann K, Binder C, Hirschberger J, Cole D, Reinacher M, Schroo S, Frost J, Egberink H, Lutz H, Hermanns W. 2003 Comparison of different tests to diagnose feline infectious peritonitis. J Vet Intern Med. 17(6): 781-790.

Ficha de Recolha de Dados
Projecto PIF: Carga Viral & Anticorpos

1. Identificação do animal

1.1. Nome: _____

1.3. Raça: _____

1.2. Idade: _____

1.4. Género e estado reprodutivo: _____

2. Origem:

Gatil

Oferta

Criador

Desconhecida

Loja

Outro: _____

Rua

3. Ambiente

3.1. Habitação:

Apartamento

Gatil

Moradia

Outro: _____

3.2. Número e espécies de animais em casa: _____

3.3. Acesso à rua:

Constante

Raro

Frequente

Nunca

4. História Progressiva

Evento stressante recente (castração, vacinação...)

Testes de diagnóstico realizados

Diarreia

Perda progressiva do apetite

Outro: _____

5. Sinais clínicos

Prostração

Mucosas pálidas

Anorexia

Febre

Perda de Peso

Icterícia

- Dilatação abdominal
- Linfadenopatia
- Palpação abdominal (ansas intestinais espessadas, linfadenopatia mesentérica, superfícies serosas irregulares)
- Sinais neurológicos (convulsões, ataxia, nistagmus, distúrbios vestibulares, parésia, alterações comportamentais, neuropatia periférica, hiperestesia, incontinência urinária...)
- Sinais oculares (uveíte, flare aquoso, *flare* vítreo, enfarte dos vasos retinianos, precipitados queráticos, hifema, hipopión, coriorretinite, descolamento da retina...)
- Outro: _____

6. Sinais hematológicos

- Anemia
- Leucocitose
- Leucopénia
- Neutrofilia
- Linfopénia
- Trombocitopénia
- Outro: _____

7. Sinais bioquímicos

- Aumento das PT
- Hipoalbuminémia
- Diminuição do ratio A:G
- Aumento das enzimas hepáticas (FAS e ALT)
- Aumento da bilirrubina total
- Outro: _____

8. Análise do derrame (se possível)

8.1. Aspecto macroscópico:

- Cor: _____
- Viscoso
- Espuma

8.2. Citologia

- Conteúdo celular <5000 células/ml
- Macrófagos
- Outras células em menor quantidade: _____
- Neutrófilos

8.3. Bioquímica

- pH
- Densidade
- Aumento das PT
- Elevado conteúdo em Globulinas
- Diminuição do ratio Albumina:Globulina

9. Histopatologia (se disponível)

10. Outros exames complementares

11. Rastreio virológico (zaragatoa rectal/ fezes)

11.1. Resultado: _____

12. Carga viral e Titulação IgG (RT-PCR e ELISA; sangue em EDTA)

12. Resultado:

12.1. Carga viral: _____

12.2. Título Ac: _____