

Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia

Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

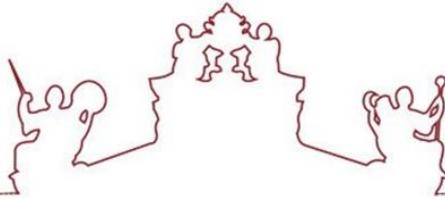
Relatório de Estágio

Diagnóstico Laboratorial em Animais de Companhia

Maria Manuel Manteiga Carvalho Roma Parreira

Orientadores / Sandra Maria Branco
Luís Miguel Lourenço Martins
Maria Paula Martins Brilhante Simões

Évora 2022



Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia

Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

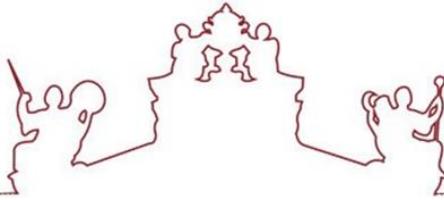
Relatório de Estágio

Diagnóstico Laboratorial em Animais de Companhia

Maria Manuel Manteiga Carvalho Roma Parreira

Orientadores / Sandra Maria Branco
Luís Miguel Lourenço Martins
Maria Paula Martins Brilhante Simões

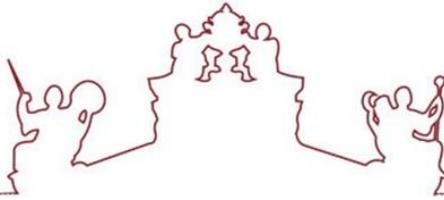
Évora 2022



O relatório de estágio foi objeto de apreciação e discussão pública pelo seguinte júri nomeado pelo Diretor da Escola de Ciências e Tecnologia:

Presidente / Rui Ferreira (Universidade de Évora)

Vogais Maria João Miranda Pires (Universidade de Trás-os-Montes
e Alto Douro) (Arguente)
Sandra Maria Branco (Universidade de Évora) (Orientador)



*“Sê todo em cada coisa. Põe quanto és
No mínimo que fazes”*

Ricardo Reis, *in* "Odes"

Agradecimentos

À minha mãe e avó Tina, por terem sido o meu maior apoio.

Às minhas queridas colegas e amigas, pela companhia, pelas conversas, pela diversão e por terem facilitado e animado os cinco anos de curso. Em especial à Mariana, Sara, Filipa e Matilde.

Ao Francisco por me fazer feliz, pela tranquilidade de quem sabe que tudo vai correr bem e por me dar confiança para terminar este trabalho.

À equipa do Laboratório Veterinário INNO, pelos ensinamentos, paciência e amizade. Foi um privilégio ter realizado o meu estágio curricular com profissionais tão talentosos e apaixonados pela Patologia Clínica Veterinária.

Às minhas orientadoras, que são exemplos para mim, professora Sandra e Dra. Paula. Ao Dr. Ricardo e ao Dr. Augusto, por toda a sua disponibilidade durante esta fase.

Por fim, à Bibi, comigo desde o meu último ano do secundário, acompanhando todo o meu percurso e auxiliando ao servir de cobaia para o estudo de uma ou outra disciplina.

Resumo

Diagnóstico Laboratorial em Animais de Companhia

O presente relatório foi realizado no âmbito do estágio curricular do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária da Universidade de Évora, encontrando-se dividido em três partes. A primeira parte corresponde à análise da casuística acompanhada durante o estágio curricular, realizado no Laboratório Veterinário INNO, entre seis de outubro de 2020 e 26 de março de 2021. A segunda parte consiste numa revisão bibliográfica sobre a Peritonite Infeciosa Felina (PIF), uma doença infecciosa, inflamatória e imunomediada. Por fim, a terceira parte apresenta um estudo retrospectivo acerca da contribuição do rácio A/G e Δ TCN das efusões cavitárias para o diagnóstico de PIF. Apesar de não existirem características bioquímicas e celulares nas efusões que permitam o diagnóstico definitivo da PIF, os resultados do estudo permitiram averiguar que este torna-se mais provável quando as efusões apresentam rácio A/G inferior a 0,88 e Δ TCN superior a 4,9.

Palavras-chave: Relatório, Peritonite Infeciosa Felina, diagnóstico, rácio A/G, Δ TCN.

Abstract

Laboratorial Diagnosis in Companion Animals

The present report refers to the internship for the completion of the Master Degree in Veterinary Medicine of the University of Évora, and is divided in three parts. The first part includes a statistical description of the followed procedures during the curricular internship, which was held at Laboratório Veterinário INNO, between October of 2020 and March of 2021. The second part consists of a bibliographic review on Feline Infectious Peritonitis (FIP), an infectious, inflammatory and immunomediated disease. Finally, the third part presents a retrospective study about the contribution of the A/G and Δ TCNN ratio of cavitory effusions to the diagnosis of FIP. Although there are no biochemical and cellular characteristics in effusions that allow the definitive diagnosis of PIF, the results of the study allowed to verify that it becomes more likely when effusions have an A/G ratio of less than 0,88 and Δ TCN greater than 4,9.

Keywords: Report, Feline Infectious Peritonitis, diagnosis, A/G ratio, Δ TCN.

Índice de Conteúdos

Agradecimentos	i
Resumo	ii
Abstract	ii
Índice de Gráficos	vi
Índice de Tabelas	vii
Índice de Figuras	viii
Lista de Abreviaturas, siglas e símbolos	x
1. Introdução	1
2. Relatório descritivo do estágio	2
2.1. Apresentação do local do estágio	2
2.2. Análise da casuística	3
2.2.2. Análise global das áreas de diagnóstico laboratorial acompanhadas	3
2.2.3. Casuística distribuída por áreas de diagnóstico laboratorial e espécie animal.....	5
2.2.3.1. Análises bioquímicas.....	5
2.2.3.2. Análises hematológicas.....	9
2.2.3.3. Urinálise.....	13
2.2.3.4. Análises microbiológicas	17
2.2.3.5. Análises parasitológicas	21
2.2.3.6. Análises serológicas	25
2.2.3.7. Análises endocrinológicas	28
2.2.3.8. Análises citológicas - citologia de efusões	31
3. Peritonite Infeciosa Felina: Revisão Bibliográfica	32
3.1. Caracterização do Coronavírus felino	32
3.2. Genoma viral.....	33
3.3. Estrutura e proteínas virais.....	34
3.4. Epidemiologia.....	36
3.4.1. Prevalência.....	36
3.4.2. Fatores de risco.....	37
3.4.3. Infecção, excreção viral e transmissão	39
3.5. Fisiopatologia	40
3.5.1. Forma avirulenta – FeCoV nos enterócitos.....	40
3.5.2. Forma virulenta – Aquisição de tropismo para os monócitos/macrófagos	40
3.5.3. Entrada do vírus nos monócitos/macrófagos e disseminação sistêmica	43
3.5.4. Resposta Imunitária do hospedeiro.....	45

3.7. Diagnóstico	47
3.7.1. Anamnese	47
3.7.2. Apresentação clínica.....	47
3.7.2.1. Forma efusiva	48
3.7.2.2. Forma não efusiva	49
3.7.3. Parâmetros hematológicos	50
3.7.4. Bioquímica sérica	50
3.7.5. Proteinograma e proteínas de fase aguda.....	51
3.7.6. Análise da efusão	52
3.7.7. Análise do líquido cefalorraquidiano.....	54
3.7.8. Imagiologia	54
3.7.9. Testes serológicos.....	55
3.7.10. Diagnóstico molecular através de RT-PCR	56
3.7.11. Histopatologia.....	57
3.7.12. Imunohistoquímica e imunocitoquímica.....	58
3.8. Tratamento.....	59
3.8.1. Tratamento anti-inflamatório e imunossupressor	59
3.8.2. Tratamento imunomodulador	60
3.8.3. Tratamento antiviral	60
3.8.3.1. Interferão α e ω	60
3.8.3.2. Inibidores das proteases	61
3.8.3.3. Nucleosídeos análogos	62
3.8.3.4. Outros fármacos antivirais.....	63
3.8.5. Monitorização do tratamento e prognóstico.....	63
3.9. Prevenção e controlo.....	64
4. Contribuição do rácio A/G e ΔTCN das efusões cavitárias para o diagnóstico de Peritonite Infeciosa Felina: estudo retrospectivo.....	65
4.1. Introdução e objetivos	65
4.2. Materiais e métodos	66
4.2.1. Tipo de estudo.....	66
4.2.2. População e amostra	67
4.2.3. Análise das efusões.....	68
4.2.4. Quantificação proteica.....	69
4.2.5. Contagem celular	70
4.2.6. Citologia das efusões.....	71
4.2.7. Diagnóstico por RT-PCR.....	72
4.3. Análise estatística.....	73
4.4. Resultados	74

4.4.1. Caracterização da população felina das amostras estudadas.....	74
4.4.2. Diagnóstico molecular de PIF	76
4.4.3. Caracterização da população de gatos com PIF	77
4.4.4. Caracterização das efusões dos gatos com PIF	78
4.4.5. Caracterização das efusões com RT-PCR negativo	79
4.5.6. Dados estatísticos sobre o Rácio A/G e Δ TCN das efusões	80
5. Discussão	82
5.1. Caracterização da população	82
5.2. Caracterização das efusões	83
5.3. Contributo do rácio A/G e Δ TCN.....	84
6. Conclusão.....	87
7. Bibliografia	88

Índice de Gráficos

Gráfico 1 - Distribuição das áreas de diagnóstico laboratorial acompanhadas durante o estágio, expressa por Fr (%).	3
Gráfico 2 - Representatividade das análises acompanhadas agrupadas por espécie, expressa por Fr (%).	4
Gráfico 3 - Distribuição dos parâmetros bioquímicos acompanhados, agrupados em sete PB, expressa por Fr (%).	6
Gráfico 4 - Distribuição das espécies animais que realizaram os parâmetros bioquímicos acompanhados, expressa por Fr (%).	7
Gráfico 5 - Distribuição dos achados detetados nos sedimentos urinários por espécie animal, expressa por Fip.	15
Gráfico 6 - Distribuição dos microrganismos isolados por análise, expressos por Fi.....	18
Gráfico 7 - Distribuição das técnicas coprológicas acompanhadas por espécie animal, expressa por Fip.	21
Gráfico 8 - Distribuição dos testes serológicos acompanhados, expressa por Fr (%).	25
Gráfico 9 - Distribuição dos agentes infecciosos investigados nas provas serológicas IFI e ELISA, por espécie animal, expressa por Fi.	26
Gráfico 10 - Distribuição dos tipos de efusões cavitárias acompanhadas por espécie animal, expressa em Fi.	31
Gráfico 11 - Distribuição dos gatos por faixa etária, expressa em Fi, n=41.....	74
Gráfico 12 - Distribuição dos gatos por raça, expressa por Fi (n=41).	75
Gráfico 13 - Distribuição das mutações detetadas no RT-PCR em tempo real na população, expressa por Fr (%) (n=41).	76
Gráfico 14 - Distribuição da raça dos gatos com PIF, expressa por Fi (n=27).	77
Gráfico 15 - Curvas ROC do rácio A/G (esquerda) e do Δ TCN (direita), obtidas pelo programa MedCalc® (Software MedCalc, versão 20.009).	80

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Distribuição das análises hematológicas realizadas por espécie animal, expressa por Fr (%) e Fi.....	9
Tabela 2 - Distribuição dos tipos de análises realizadas à urina por espécie animal, expressa por Fi, Fip e Fr (%)......	13
Tabela 3 - Distribuição das análises microbiológicas por tipo de amostra e por espécie animal, expressa em Fip, Fi e Fr (%)......	17
Tabela 4 - Distribuição das formas parasitárias detetadas no exame coprológico por espécie animal, expressa por Fip, Fi e Fr (%)......	23
Tabela 5 - Distribuição dos doseamentos séricos hormonais e testes endócrinos por órgão endócrino e por espécie animal, expressa por Fip, Fi e Fr (%)......	28
Tabela 6 - Distribuição das doenças endócrinas suspeitas por doseamento sérico hormonal e por espécie animal, expressa por Fip, Fi e Fr (%)......	29
Tabela 7 - Classificação das efusões com base no conteúdo proteico, contagem total de células nucleadas (CTCN) e avaliação citológica.	68
Tabela 8 - Resultados possíveis do teste de RT-PCR em tempo real e respetiva interpretação.	72
Tabela 9 - Média e mediana da idade dos gatos com PIF.	77
Tabela 10 – Mediana, valor mínimo e valor máximo dos parâmetros analisados nas efusões dos gatos com PIF.....	78
Tabela 11 - Mediana, valor mínimo e valor máximo dos parâmetros analisados nas efusões dos gatos sem PIF.....	79
Tabela 12 - Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN) dos diferentes valores cut-off, para o rácio A/G, num intervalo de confiança de 95%.....	81
Tabela 13 - Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN) dos diferentes valores cut-off, para o Δ TCN, num intervalo de confiança de 95%.....	81

Índice de Figuras

- Figura 1** - Laboratório Veterinário INNO (fotografia gentilmente cedida pelo Laboratório Veterinário INNO). 1
- Figura 2** - Proteinogramas obtidos por eletroforese capilar. Em (A) está representado o proteinograma de um felídeo com hiperalbuminémia e gamopatia monoclonal. Em (B) está representado o proteinograma de um canídeo com gamopatia policlonal. Adaptado de casos do L.V. INNO.8
- Figura 3** – Compatível com Síndrome Linfoproliferativo. No histograma, o gráfico de dispersão DIFF apresenta uma distribuição da população de linfócitos concentrada na região de elevada fluorescência e uma região superior (seta preta) em que o analisador não conseguiu realizar a sua identificação, sendo consideradas células atípicas; eixo dos xx: SSC; eixo dos yy: SFL. No gráfico de dispersão WBC/BASO visualiza-se grande concentração de células resistentes à lise, típico de células neoplásicas; eixo dos xx: SSC; eixo dos yy: FSC. À direita está representada a confirmação de SL pelo esfregaço sanguíneo corado com Diff-Quik®. Visualiza-se uma população de linfócitos atípicos de pequenas e médias dimensões, com núcleo redondo a oval, por vezes indentado, o citoplasma apresenta (por vezes) cor azul-escura. Ampliação 500x e 1000x. Adaptado de caso de hematologia do L.V. INNO. 11
- Figura 4** - Fotomicrografias de esfregaços sanguíneos corados com Diff-Quik®, contendo hemoparasitas. (A) Microrganismos compatíveis com *Mycoplasma* spp. (seta preta), ampliação de 1000x. (B) Microfilária numa amostra de sangue de canídeo, ampliação 500x. (C) Oito formas intra-eritrocitárias compatíveis com merozoítos de *Babesia* spp. (seta amarela), ampliação de 1000x. (D) Inclusão de Lentz no citoplasma de um monócito canino (seta verde) provocada pelo vírus da esgana, ampliação de 1000x. (E) Microrganismo compatível com *Hepatozoon* spp. no citoplasma de um neutrófilo (seta branca), ampliação de 500x. Adaptado de casos de hematologia do L.V. INNO..... 12
- Figura 5** - Fotomicrografias de sedimentos urinários. Ampliação de 400x. (A) Piúria acentuada (abundantes leucócitos, seta vermelha), bacilos (seta verde) e cocos em plano de fundo, compatíveis com infecção do trato urinário. (B) Abundantes eritrócitos e cristais de fosfato de amónio magnésiano (estruvite, seta preta), compatíveis com hematúria e cristalúria. (C) Cristais de uratos de amónio ou xantina. (D) Cristais de cistina. (E) Cristais de oxalato de cálcio dihidratado. (F) Cristais de oxalato de cálcio monohidratado. (G) Cristais de bilirrubina. Adaptado de casos de urianálise do L.V. INNO. 16
- Figura 6** – Fotomicrografia, corada pelo método Gram, de microrganismos compatíveis com *Malassezia* spp., em ampliação 1000x. Adaptado de caso de microbiologia do L.V. INNO. 19
- Figura 7** - Sistema de identificação microbiológica e realização de testes de sensibilidade antimicrobiana, VITEK® 2 Compact (bioMérieux, Inc. Hazelwood, MO). Fotografia original da autora captada durante o estágio no L.V. INNO.....20
- Figura 8** - Fotomicrografias de diversas formas parasitárias detetadas no exame fecal. Ampliação de 400x. (A) Quistos de *Giardia* spp. (B) Ovos de *Trichuris* spp. (C) Ovo de estrôngilo (*Uncinaria* spp., *Ancylostoma* spp.). (D) Oocistos de *Cystoisospora* spp. (E) Ovos de *Toxocara* spp. (F) *Cineclomyces guttulatus*. (G) Larva de *Aelurostrongylus* spp. Adaptado de casos de parasitologia do L.V. INNO.22
- Figura 9** - Em (A) está representado o kit do teste LeiScan® leishmania ELISA (laboratório Dr. Esteve S.A., Barcelona, Espanha). Em (B) está representada a placa com o resultado de um

teste LeiScan®. Os poços de cor amarela correspondem a resultados positivos. Fotografias captadas pela autora durante o estágio no L.V. INNO.	27
Figura 10 - Organização esquemática do genoma dos FeCoV. ORFs 1a e 1b (retângulos cinzentos); ORFs S, M, E e N (retângulos brancos); ORFs 3a,3b,3c,7a,7b (retângulos pretos). Adaptado de Tekes & Thiel (2016) [22].	33
Figura 11 - Representação esquemática das proteínas estruturais dos FeCoV. Adaptado de Haake et al (2020) [23].	34
Figura 12 - Representação esquemática do ectodominio da proteína da espícula. Adaptado de Jaimes et al (2020) [24].	35
Figura 13 - Representação esquemática do ciclo de vida do FeCoV. Adaptado de Masters (2006) [51].	44
Figura 14 - Ascite presente num gato da raça British Shorthair com a forma efusiva de PIF. De notar o paciente com abdômen distendido e pendular. Adaptado de Barker & Tasker (2019) [58].	48
Figura 15 - A imagem do lado esquerdo mostra precipitados queráticos na córnea interna e a forma da pupila em D invertido devido à infiltração de células inflamatórias na íris; adaptado de Pedersen et al (2009) [56]. A imagem do lado direito mostra uveíte anterior no olho direito, com neovascularização (rubeosis iridis) e hifema; adaptado de Dreschler, et al (2011) [34].	49
Figura 16 – (A) amostra de efusão abdominal de cor palha, límpida e viscosa, típica de um gato com PIF, adaptado de Barker & Tasker, (2020) [50]. (B) teste de Rivalta positivo, após ser colocada uma gota de efusão abdominal sobre a superfície da solução de 8 mL de água destilada e ácido acético a 98%, a gota manteve a sua forma à superfície, adaptado de Fischer et al (2012) [65]. (C) citologia de transudado modificado típico de PIF com escassa celularidade, neutrófilo não degenerado (seta preta) e monócito (seta vermelha) sobre um fundo granular eosinofílico proteico (Adaptado de caso de citologia do L.V. INNO).	53
Figura 17 - A imagem do lado esquerdo mostra a necrópsia de um gato, onde se visualizam placas lisas branco-amareladas que cobrem as superfícies parietal e visceral do peritoneu (seta branca) e os linfonodos do intestino aumentados (seta preta), adaptado de Dreschler et al (2011) [34]. A imagem do lado direito mostra um corte histológico do intestino com enterite crónica grave e extensa, constituída por áreas linfocíticas e piogranulomatosas, com vasculite (adaptado de caso de histopatologia do L. V. INNO).	57
Figura 18 - Sistema de citocentrifugação. Fotografias originais da autora captadas durante o estágio no L.V. INNO.	71

Lista de Abreviaturas, siglas e símbolos

ACTH: *Adrenocorticotropic hormone* (hormona adrenocorticotrófica)

AGP: *Alpha-1-acid glycoprotein* (Alfa-1 glicoproteína ácida)

ALP: Fosfatase alcalina

ALT: Alanina aminotransferase

ADE: *Antibody-Dependent Enhancement of Infectivity* (Potenciação da infecção dependente de anticorpos)

Ca: Cálcio

CaCoV: *Canine Coronavirus* (Coronavírus Canino)

Cl: Cloreto

CBC: *Complete blood count* (Hemograma)

DC-SIGN: *Dendritic cell specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing non integrin*

CTCN: Contagem total de células nucleadas

dl: Decilitros

EDTA: *Ethylenediamine tetraacetic acid* (ácido etilendiamino tetra-acético)

ELISA: *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ensaio enzimático de imunoadsorção)

Fi: Frequência absoluta

Fr: Frequência relativa

Fip: Frequência absoluta por espécie

FeCoV: *Feline Coronavirus* (Coronavírus Felino)

FECV: *Feline Enteric Coronavirus* (Coronavírus Entérico Felino)

FeLV: *Feline leukemia virus* (Vírus da Leucemia felina)

FIV: *Feline immunodeficiency virus* (Vírus da imunodeficiência felina)

DC-SIGN: *Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin* (molécula de adesão intercelular específica de células dendríticas)

FSC: *Foward scattered light* (Luz dispersa frontal)

fAPN: *Feline aminopeptidase-N* (Aminopeptidase-N felina)

FT4: *Free tiroxine* (tiroxina livre)

fl: Fentolitros

FB: Fibrinogénio

GGT: Gama Glutamil Transferase

GM: Gamopatas monoclonais

GP: Gamopatas policlonais

HTF: Hipertiroidismo felino

IgA: Imunoglobulina A

IFI: Imunofluorescência Indireta

IFN- γ : *Interferon gamma* (Interferão-gama)

IL-1: *Interleukin-1* (Interleucina 1)

IL-6: *Interleukin-6* (Interleucina 1)

K: Potássio

kb: Kilobase

L.V. INNO: Laboratório Veterinário INNO

LDH: Lactato desidrogenase

LCE: Líquido cérebroespinal

Mg: Magnésio

ml: Mililitros

Na: Sódio

n: número total de animais

ORF: *Open Reading Frames* (quadros de leitura abertos)

PIF: Peritonite Infeciosa Felina

PIFV: Vírus da Peritonite Infeciosa Felina

PT: Proteínas totais

PLI: *Pancreatic Lipase Immunoreactivity* (Imunoreactividade da Lipase Pancreática)

P. ex.: Por exemplo

pg: Picogramas

P4: Progesterona

RT-PCR: *Reverse transcription polymerase chain reaction* (transcriptase reversa seguida de reação em cadeia de polimerase)

RNA: *Ribonucleic acid* (Ácido ribonucleico)

SSC: *Side scattered light* (Luz dispersa lateral)

SFL: *Side fluorescent light* (Luz fluorescente lateral)

SID: *Semel in die* (a cada 24 horas)

T3: Triiodotironina

T4: Tiroxina total

TLI: *Trypsin-Like Immunoreactivity* (Imunoreactividade Semelhante a Tripsina)

TTPA: Tempo de Tromboplastina Parcialmente Ativada

ΔTCN: *Delta* total de células nucleadas

TP: Tempo de Protrombina

TGeV: *Transmissible gastroenteritis vírus* (Vírus da Gastroenterite Transmissível Porcina)

TSH: *thyroid-stimulating hormone* (Hormona tireoestimulante)

TNF-α: *Tumor necrosis factor – α* (Fator de necrose tumoral-alfa)

WBC/BASO: *White blood cells/ Basophils* (Canal diferencial de basófilos)

WBC/DIFF: *White blood cells/Differential channel* (Canal diferencial de leucócitos)

UPC: *Urine protein:creatinine* (Proteína: creatinina na urina)

USG: *Urine specific gravity* (Gravidade específica da urina, densidade urinária)

VCM: Volume corpuscular médio

ZnSO4: Sulfato de zinco

μl: Microlitros

ω: *Omega*

α: *Alfa*

γ: *Gamma*

β: *Beta*

1. Introdução

O presente relatório foi elaborado no âmbito do estágio curricular do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária da Universidade de Évora e relata as atividades desenvolvidas durante o mesmo, que decorreu no Laboratório Veterinário INNO (abreviatura da palavra *Innovation*) (Figura 1).

Realizado em contexto laboratorial, o estágio apresentou como objetivo principal a aquisição de competências práticas na área da Patologia Clínica de Animais de Companhia, devido ao especial interesse por esta área da Medicina Veterinária. Foi acompanhada a rotina diária do laboratório, completando 40 horas semanais, num sistema de horário rotativo das nove horas às 18 horas ou das 13 horas às 21 horas. O estágio curricular permitiu o conhecimento e realização de análises em todos os equipamentos do laboratório, assim como a interpretação dos resultados dos exames efetuados e a sua relação com os possíveis diagnósticos.

Ao longo destes seis meses, foi registada informação acerca das análises acompanhadas nas diferentes áreas de diagnóstico laboratorial, a qual serviu de base para a realização do presente relatório, que se divide em três partes. Na primeira parte será exposta uma análise geral da casuística, que integra todos os procedimentos observados e efetuados, organizados por áreas de diagnóstico laboratorial e por espécie animal, a qual irá incluir uma breve descrição dos procedimentos que suscitaram mais interesse. A segunda parte consiste numa revisão bibliográfica sobre a Peritonite Infeciosa Felina. Por fim, a terceira e última parte apresenta um estudo retrospectivo, enquadrado no tema da revisão bibliográfica.

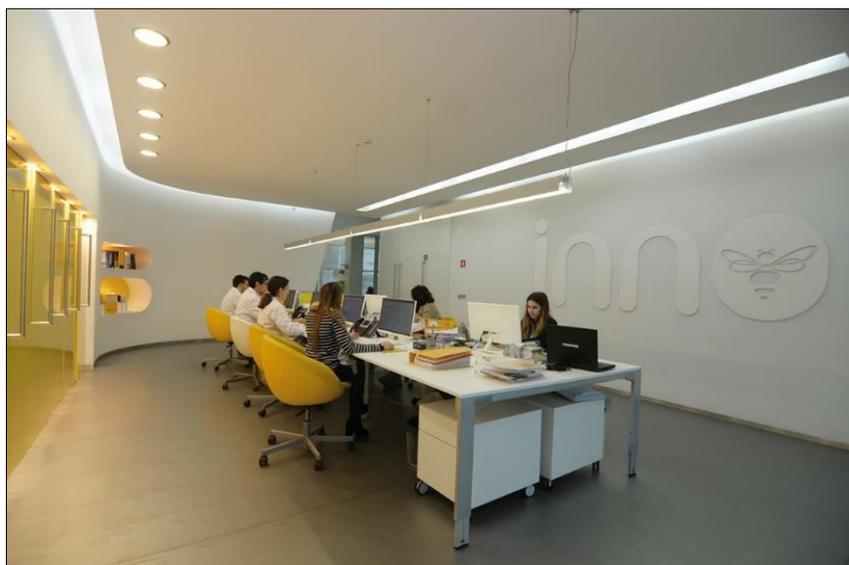


Figura 1 - Laboratório Veterinário INNO (fotografia gentilmente cedida pelo Laboratório Veterinário INNO).

2. Relatório descritivo do estágio

2.1. Apresentação do local do estágio

Com o objetivo de auxiliar e melhorar o diagnóstico clínico veterinário e, por conseguinte, os cuidados de saúde prestados a todos os animais, foi inaugurado em 2007, o Laboratório Veterinário INNO (L.V. INNO), localizado na cidade de Braga. Trata-se de uma empresa que disponibiliza serviços especializados na área da Patologia Clínica Veterinária, através do uso de meios tecnológicos inovadores aliados a uma equipa multidisciplinar, composta por médicos veterinários, técnicos superiores de diagnóstico, administrativos, operacionais e estafetas.

No que concerne às instalações do L.V. INNO, estas encontram-se organizadas em 6 áreas de trabalho distintas: 1) zona destinada a receber as amostras; 2) zona administrativa e de apoio ao cliente; 3) laboratório de análises clínicas e de citologia (onde se realizam análises hematológicas, bioquímicas, endocrinológicas, parasitológicas, citológicas e urianálise); 4) laboratório de histopatologia; 5) laboratório de microbiologia; 6) laboratório de imunologia. Em parceria com laboratórios de diagnóstico internacionais, esta empresa dispõe também de um amplo catálogo de provas de diagnóstico nas áreas de biologia molecular, genética, toxicologia e alergologia.

Ao L.V. INNO chegam diariamente amostras biológicas de todo o país (continente e arquipélagos) através de correio, empresas transportadoras e viaturas próprias do laboratório.

Para que o diagnóstico clínico possa ser confirmado com sucesso, as análises solicitadas ao L.V. INNO devem ser realizadas em amostras adequadas. Para tal, o L.V. INNO fornece recipientes adaptados aos vários tipos de amostras, para que as mesmas possam ser colhidas e enviadas da forma mais asséptica possível e devidamente acondicionadas. As amostras são sempre acompanhadas de uma ficha de requisição específica, fornecida também pelo laboratório, onde devem constar a identificação do Centro de Atendimento Médico-Veterinário, do médico veterinário requerente, do paciente (incluindo o nome, idade, género, raça, história clínica), do tutor, o tipo de material biológico colhido, assim como as análises solicitadas.

Todas as análises requisitadas e que chegam ao laboratório são inseridas no seu sistema informático interno, o *Clinidata XXI*[®] (Maxdata Software, Portugal), de forma a orientar o trabalho por áreas de atuação específicas, bem como manter um registo atualizado dos dados gerais dos pacientes e dos resultados de todas as análises efetuadas pelos mesmos.

No L.V. INNO a maioria das análises clínicas são realizadas em equipamentos totalmente automáticos, aos quais é aplicado diariamente um sistema de controlo de qualidade, no sentido de fornecer resultados fiáveis que refletem de forma precisa e exata o que está a acontecer no organismo dos pacientes.

2.2. Análise da casuística

De seis de outubro de 2020 a 26 de março de 2021, no âmbito do estágio curricular, existiu um contacto direto com o meio profissional, pela realização e interpretação de diversas análises de apoio ao diagnóstico médico-veterinário efetuadas nas instalações do L.V. INNO. De modo a facilitar a compreensão da informação recolhida, foi realizada uma análise da casuística.

Serão apresentadas tabelas e gráficos onde constam: frequências absolutas (Fi), frequências absolutas por espécie (Fip) e frequências relativas (Fr (%)). Foram apenas contabilizadas as análises diretamente acompanhadas durante o período de estágio. Por isso, o número de análises registadas não corresponde ao número de análises solicitadas ao L.V. INNO durante o período de tempo referido.

2.2.2. Análise global das áreas de diagnóstico laboratorial acompanhadas

O número total de análises laboratoriais acompanhadas, que constituíram um apoio auxiliar no diagnóstico em clínica de animais de companhia, durante os seis meses de estágio, correspondeu a um total de 2340 análises, tendo estas sido agrupadas em diferentes áreas diagnósticas, conforme é ilustrado no **Gráfico 1**.

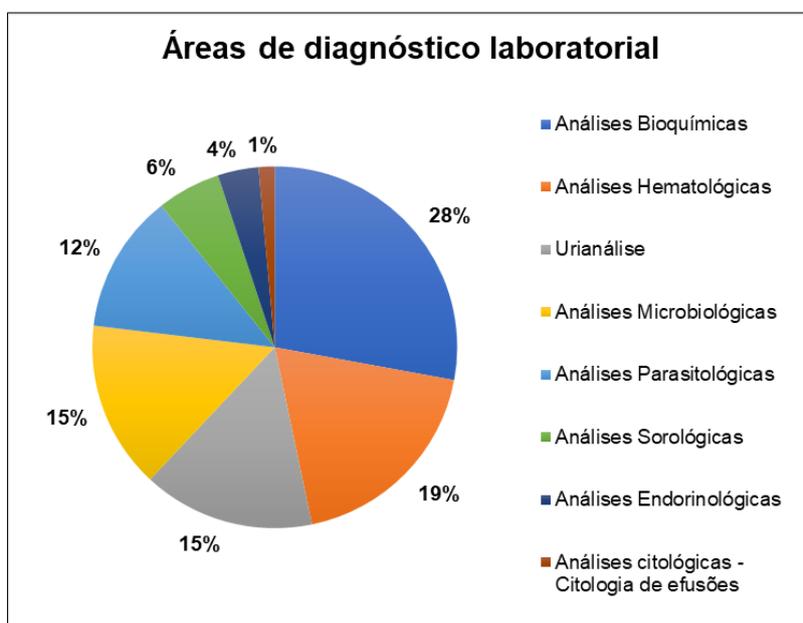


Gráfico 1 - Distribuição das áreas de diagnóstico laboratorial acompanhadas durante o estágio, expressa por Fr (%).

Pode constatar-se que as áreas de diagnóstico laboratorial mais acompanhadas foram as áreas das análises bioquímicas e hematológicas que corresponderam a 648 (Fr=28%) e 437 (Fr=19%) análises, respetivamente. Além destas foram também acompanhadas 354 urianálises (Fr=15%), 347 análises microbiológicas (Fr=15%), 288 análises parasitológicas (Fr=12%) e 149 análises serológicas (Fr=6%). As áreas das análises endocrinológicas (Fi=84; Fr=4%) e citológicas (Fi=33; Fr=1%) foram as áreas menos representativas.

Algumas áreas não serão abordadas por não terem sido suficientemente acompanhadas como é o caso da Histopatologia.

Relativamente à espécie animal, pode-se concluir pelo **Gráfico 2** que a mais frequente foi a canina (*Canis lupus familiaris*), com 1354 análises acompanhadas (Fr=58%), seguindo-se a espécie felina (*Felis silvestris catus*), com 986 análises acompanhadas (Fr=42%).

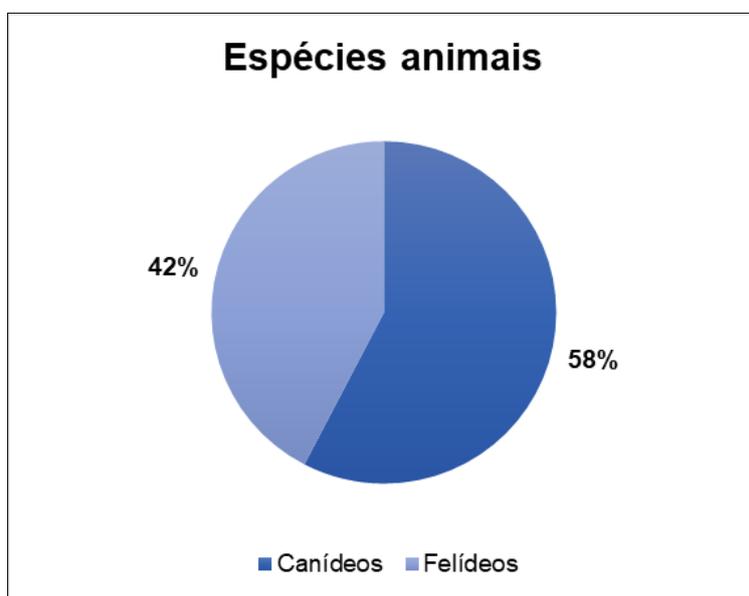


Gráfico 2 - Representatividade das análises acompanhadas agrupadas por espécie, expressa por Fr (%).

2.2.3. Casuística distribuída por áreas de diagnóstico laboratorial e espécie animal

2.2.3.1. Análises bioquímicas

Durante o estágio a avaliação bioquímica baseou-se na mensuração da concentração e/ou atividade de vários parâmetros químicos biológicos, nomeadamente eletrólitos, metabolitos, enzimas e proteínas, com o propósito de investigar a função e a lesão em vários órgãos.

Nesta área de diagnóstico laboratorial, foram acompanhadas a realização e interpretação de 648 análises, as quais foram reunidas em sete perfis bioquímicos (PB) – “Proteinograma”, “Perfil Hepático”, “Perfil Renal”, “Perfil Pancreático”, “Perfil Metabólico Energético”, “Perfil Coagulação” e “Ionograma”. Esta abordagem permitiu reconhecer mais facilmente padrões particulares de alterações e agrupá-las por sistemas, tecidos e/ou órgãos, de forma a facilitar o diagnóstico. Além disso, a interpretação das análises bioquímicas foi realizada de forma rigorosa de acordo com a história clínica do paciente e o intervalo de referência estabelecido.

O **Gráfico 3** expõe os PB acompanhados, assim como os parâmetros bioquímicos determinados em cada um deles. O “Perfil Hepático” englobou a medição da concentração de ácidos biliares, bilirrubina direta e indireta, e medição da atividade das enzimas alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), gama glutamil transferase (GGT) e fosfatase alcalina (ALP). O “Proteinograma” incluiu a medição da concentração de proteínas totais (PT), albumina, globulinas e rácio albumina/globulinas (A/G). O “Perfil Renal” compreendeu a medição da ureia, creatinina e fosforo. O “Perfil Metabólico Energético” incluiu a medição da concentração de glucose, frutossamina triglicéridos e colesterol. O “Perfil Pancreático” abrangeu a medição da concentração de amílase, lípase, imunoreactividade da lipase pancreática (PLI) e imunoreactividade semelhante a tripsina (TLI). O “Perfil Coagulação” englobou a mensuração do tempo de protrombina (TP), tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA) e fibrinogénio (FB). O “Ionograma” incluiu a medição do sódio (Na), cloreto (Cl) e potássio (K), contudo de forma a simplificar o tratamento e apresentação dos dados foram incluídos neste perfil o magnésio (Mg) e cálcio (Ca).

Os PB mais frequentes foram o “Perfil Hepático” (Fi=227; Fr=35%), seguido pelo “Proteinograma” (Fi=162; Fr=25%) e, por fim, o “Perfil Renal” (Fi=124; Fr=19%). Além destes também foram acompanhados o “Perfil Metabólico Energético” (Fi=45; Fr=7%), o “Perfil Pancreático” (Fi=39; Fr=6%) e o “Perfil Coagulação” (Fi=32; Fr=5%). O PB menos frequente foi o “Ionograma”, representando 3% (Fi=19) do total de PB acompanhados.

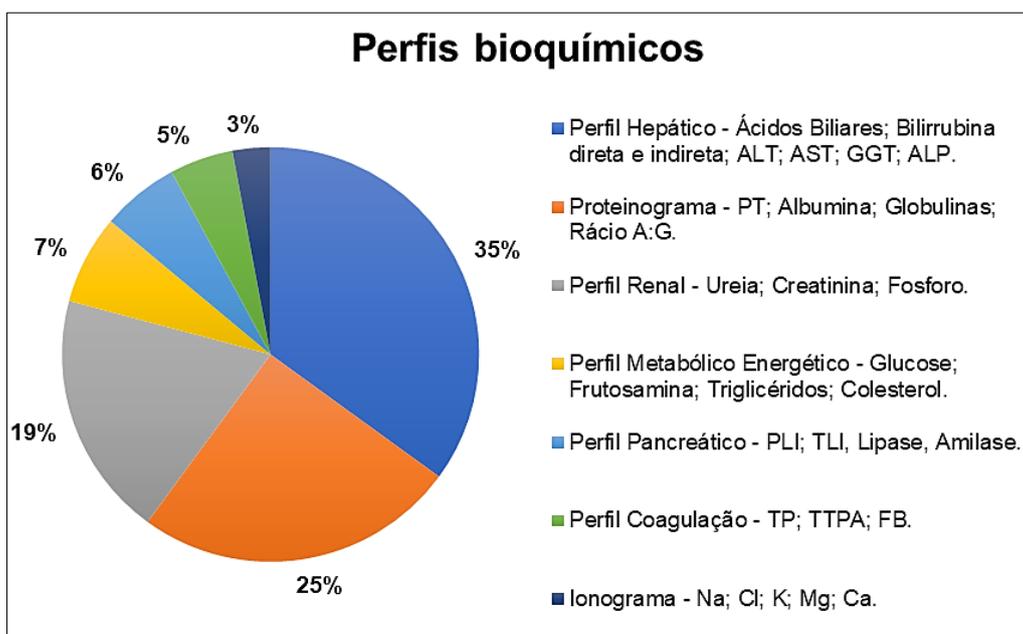


Gráfico 3 - Distribuição dos parâmetros bioquímicos acompanhados, agrupados em sete PB, expressa por Fr (%).

Relativamente à espécie animal, pode-se concluir pelo **Gráfico 4** que 65% das análises bioquímicas acompanhadas pertenceram a canídeos (Fi=421) e as restantes 35% pertenceram a felídeos (Fi=227).

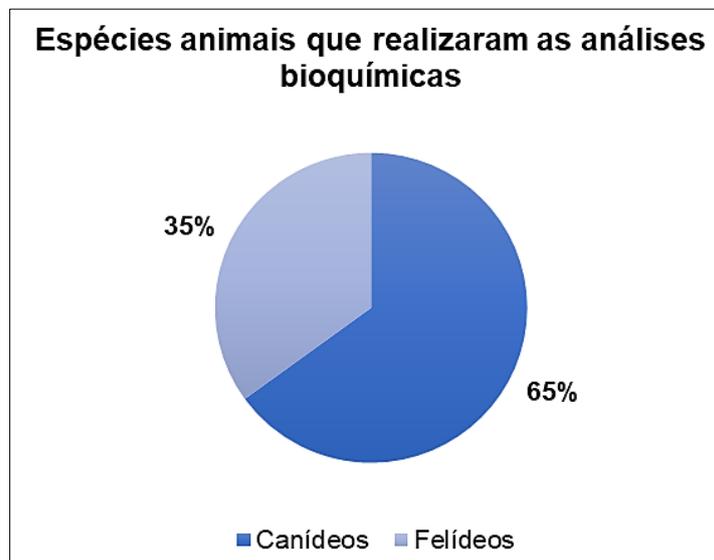


Gráfico 4 - Distribuição das espécies animais que realizaram os parâmetros bioquímicos acompanhados, expressa por Fr (%).

As análises bioquímicas foram realizadas em vários equipamentos automáticos, de entre os quais se destaca o analisador *Cobas® 6000* (módulo c501, Roche, Alemanha). Este equipamento utiliza várias cassetes diferentes, pré-carregadas com substâncias químicas específicas que reagem com as amostras biológicas para determinar a concentração e/ou atividade dos parâmetros bioquímicos pretendidos.

As análises bioquímicas foram realizadas a partir de amostras de soro ou de plasma heparinizado. É preferível o uso de soro em relação ao plasma heparinizado para quantificar todos os parâmetros bioquímicos exceto o potássio, que é mais alto no soro do que no plasma heparinizado, devido à libertação de potássio pelas plaquetas durante a coagulação [1]. Assim, foram usadas amostras de sangue total previamente colhidas para tubos de soro (isentos de substâncias anticoagulantes, mas que possuem substâncias ativadoras da coagulação) ou tubos secos estéreis, caso os primeiros estivessem indisponíveis. As amostras foram centrifugadas a 3500 rotações durante 10 minutos na centrífuga *Kubota 5400®* (Kubota Corporation, Japão). Após a centrifugação, o soro foi separado dos componentes celulares, sendo de seguida realizada a análise das amostras no respetivo equipamento automático.

Como exposto anteriormente, o PB “Proteinograma” foi um dos mais acompanhados no período de estágio. Esta análise permitiu não só quantificar as proteínas séricas totais, mas também separar e quantificar grupos individuais de proteínas, nomeadamente a albumina e as globulinas (alfa, beta e gama).

O “Proteinograma” é uma análise importante na detecção, diagnóstico e monitorização de várias doenças que envolvem disproteinémias, causadas p. ex. por, agentes infecciosos, processos inflamatórios, estados de imunodeficiência, bem como paraproteinémias causadas por neoplasias [2]. Este PB foi realizado, em amostras de soro, no analisador *Minicap*[®] (Sebia, Italia). Através do princípio da eletroforese capilar, numa solução livre, o referido equipamento separa as diferentes frações proteicas de acordo com o pH do eletrólito e o fluxo eletro-osmótico. Este método permite dividir as proteínas séricas em seis frações: Albumina (Alb), α_1 , α_2 , β_1 , β_2 e γ globulinas (**Figura 2**).

Duas alterações relativamente comuns e com significado clínico na distribuição eletroforética das proteínas séricas em cães e gatos ocorrem na região das gama globulinas, e são as gammatopias monoclonais (GM) e gammatopias policlonais (GP).

As GM são caracterizadas por um pico pontiagudo e homogêneo na região das γ -globulinas (**Figura 2A**), refletindo a presença de quantidades excessivas de apenas um tipo de imunoglobulina. As GM ocorrem frequentemente em neoplasias linfóides, incluindo mieloma múltiplo, linfoma, leucemia linfocítica crônica e macroglobulinemia. Ocasionalmente, podem ser observadas GM em distúrbios não neoplásicos tais como amiloidose, ehrliquiose, leishmaniose visceral, peritonite infecciosa felina e gastroenterocolite plasmocítica [2].

As GP refletem a presença de uma hipergamaglobulinemia difusa, na qual mais do que uma classe de imunoglobulinas está aumentada. Caracteriza-se por um aumento difuso e amplo na zona da γ -globulinas (**Figura 2B**). As causas mais comuns estão associadas a estimulação antigénica crônica que ocorre em processos inflamatórios ou infecciosos crônicos (p. ex., gastrointestinais, respiratórios, endócrinos, cardíacos), infecções severas, bem como doenças imuno-mediadas [2].

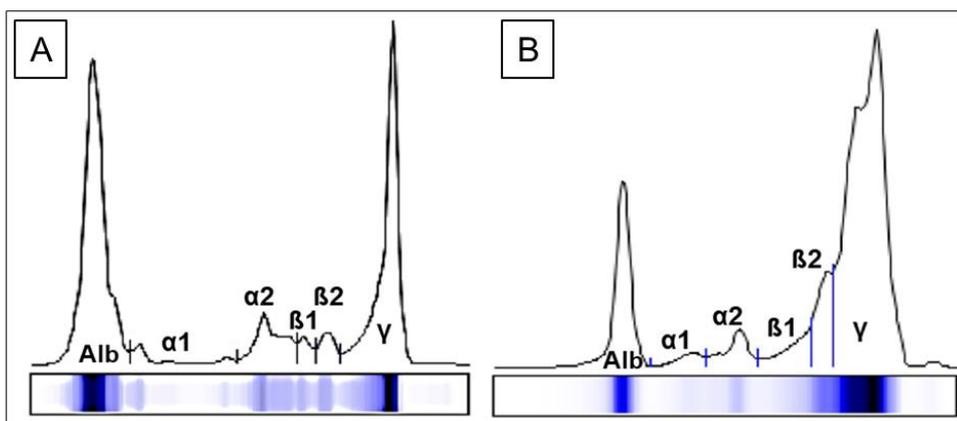


Figura 2 - Proteinogramas obtidos por eletroforese capilar. Em (A) está representado o proteinograma de um felídeo com hiperalbuminémia e gammatopia monoclonal. Em (B) está representado o proteinograma de um canídeo com gammatopia policlonal. Adaptado de casos do L.V. INNO.

2.2.3.2. Análises hematológicas

Foram incluídas nesta área de diagnóstico laboratorial um número total de 437 análises hematológicas acompanhadas durante o período de estágio, nomeadamente: hemograma; esfregaço de sangue; hemograma em conjunto com esfregaço de sangue; hemograma em conjunto com esfregaço de sangue e contagem de reticulócitos e tipificação sanguínea (**Tabela 1**).

Verifica-se que a análise “Hemograma” foi a mais frequente ($F_i=294$), possuindo uma frequência relativa de 67,3%, seguida pelo “Esfregaço de sangue” ($F_i=74$), com uma representatividade de 16,9%. Ambas constituem meios auxiliares de diagnóstico hematológico com notória representatividade. Tal facto está associado à elevada prática destas análises na rotina laboratorial e no exercício da prática clínica diária. A tipificação sanguínea foi realizada apenas numa amostra de sangue de felídeo, representando 0,2% das análises hematológicas acompanhadas.

Tabela 1 - Distribuição das análises hematológicas realizadas por espécie animal, expressa por F_r (%) e F_i .

Análise Hematológica	Fip		F _i	F _r (%)
	Canídeos	Felídeos		
Hemograma	153	141	294	67,3
Esfregaço de sangue	41	33	74	16,9
Hemograma + Esfregaços de sangue	19	25	44	10,1
Hemograma + Esfregaço de sangue + Contagem de reticulócitos	13	11	24	5,5
Tipificação sanguínea	0	1	1	0,2
Total	226	211	437	100

O hemograma (CBC) e o esfregaço sanguíneo representam meios auxiliares de diagnóstico através dos quais os principais componentes celulares sanguíneos (eritrócitos, leucócitos e plaquetas) são avaliados quantitativa e qualitativamente no seu todo.

No que diz respeito ao CBC realizado rotineiramente no L.V. INNO, este é um exame quantitativo, que disponibiliza informação acerca das contagens totais e diferenciais dos leucócitos, dos parâmetros e índices eritrocitários e das contagens de plaquetas [3].

A avaliação dos leucócitos engloba a determinação das contagens totais (por μL de sangue) e das contagens diferenciais relativa (em percentagem) e absoluta (por μL de sangue), constituindo o leucograma. A sua interpretação permite identificar alterações compatíveis com processos patológicos sistémicos, tais como inflamações, infeções e neoplasias, estas últimas associadas a síndromes linfoproliferativas, como leucemias e linfomas, e em raros casos, mastocitomas sistémicos [3].

A avaliação dos eritrócitos, que constitui o eritrograma, engloba a determinação dos parâmetros eritrocitários, que avaliam quantitativamente os eritrócitos e englobam a contagem do número total de eritrócitos (por μL de sangue), o hematócrito (percentagem de eritrócitos por volume de sangue) e o teor de hemoglobina (medido em g/dL). A avaliação conjunta destes parâmetros permite detetar a presença de anemia. Os índices eritrocitários avaliam qualitativamente os eritrócitos e incluem o volume corpuscular médio (o volume médio da massa eritrocitária, medido em fL), a concentração de hemoglobina corpuscular média (quantidade média de hemoglobina num determinado volume de sangue, medida em g/dL), a hemoglobina corpuscular média (a quantidade média de hemoglobina dentro de cada eritrócito, medida em pg) e a amplitude de distribuição do volume eritrocitário (grau de variação média do tamanho dos eritrócitos, medida em percentagem). A avaliação dos índices eritrocitários auxilia na caracterização da anemia [3].

Em relação à contagem absoluta dos reticulócitos (por μL de sangue), esta apenas é incluída no hemograma de rotina quando solicitada, tendo como objetivo avaliar a resposta regenerativa perante uma situação de anemia [3].

A avaliação das plaquetas engloba a contagem total de plaquetas (por μL de sangue), o plaquetócrito (percentagem de plaquetas no volume sanguíneo) e o volume plaquetário médio (medido em fL), constituindo o plaquetograma. A sua determinação permite investigar a presença de trombocitopenias (associadas p. ex. a hemorragia severa, causas infecciosas ou imunomediadas) ou trombocitoses (associadas p. ex. a processos inflamatórios ou administração de fármacos) [3].

Os hemogramas foram realizados recorrendo a um analisador hematológico automático, o *Sysmex XT – 2000iV*[®] (*Sysmex Corporation, Kobe, Japão*). Este equipamento utiliza os métodos de impedância e de citometria de fluxo para disponibilizar os valores das contagens totais e diferenciais das células sanguíneas. Pelo método de impedância as células são lançadas através de uma pequena abertura entre dois elétrodos e a sua passagem através dessa abertura origina um pulso de voltagem mensurável. A frequência de pulsos indica o número de células e a magnitude na alteração da resistência elétrica determina o volume destas células [4]. Através da citometria de fluxo as células são coradas com uma substância fluorescente (a polimetina), que se liga aos ácidos nucleicos e organelos citoplasmáticos, passando de seguida individualmente através de um feixe laser, absorvendo e dispersando a luz [4].

Pela citometria de fluxo, as células são diferenciadas (canal WBC/DIFF) em neutrófilos, linfócitos, monócitos e eosinófilos pela estrutura interna (SSC), pelo tamanho celular (FSC) e pelo conteúdo em ácidos nucleicos (SFL). Já os basófilos são identificados e quantificados (canal WBC/BASO) pela SSC e pelo FSC das células resistentes à lise, através do uso de uma solução ácida forte que colapsa todas as células nucleadas, com exceção dos basófilos [5].

Os resultados do CBC são interpretados de acordo com os intervalos de referência estabelecidos para o equipamento *Sysmex XT – 2000iV*[®] e com os histogramas. Estes últimos juntamente com o esfregaço sanguíneo, permitem avaliar as contagens e distribuições celulares, sendo fundamentais para detetar células atípicas (eritrócitos nucleados, blastos e granulócitos imaturos) (**Figura 3**). A avaliação conjunta do CBC e esfregaço, também permite detetar erros na separação das células, particularmente nos felídeos, nos quais é comum a sobreposição das grandes plaquetas com os eritrócitos e a presença de agregados plaquetários, o que subestima a contagem de plaquetas pelo equipamento [5].

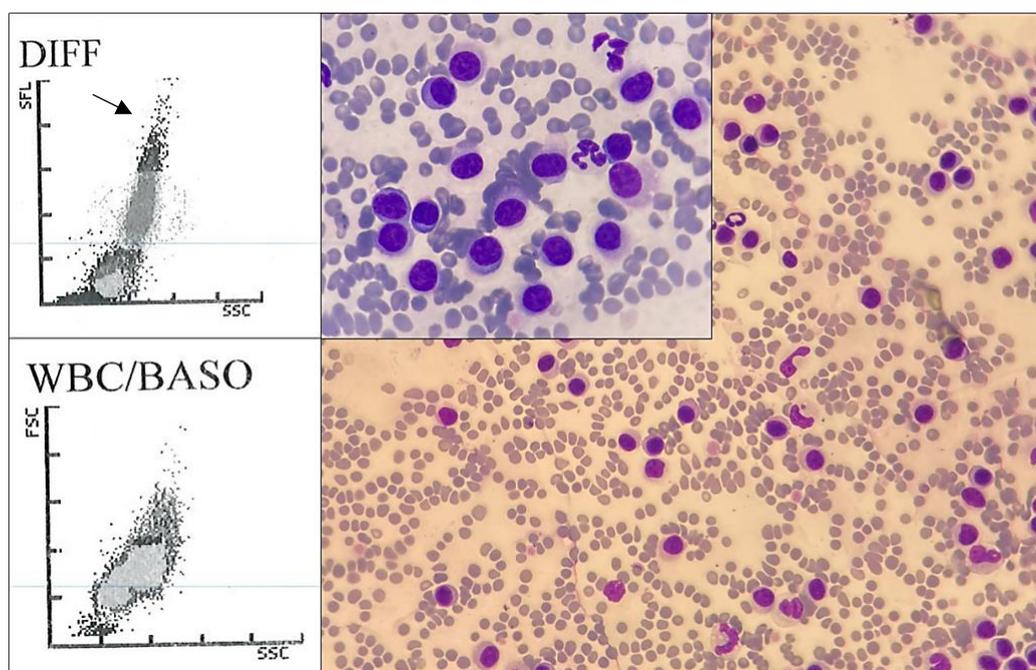


Figura 3 – Compatível com uma síndrome linfoproliferativa. No histograma, o gráfico de dispersão DIFF apresenta uma distribuição da população de linfócitos concentrada na região de elevada fluorescência e uma região superior (seta preta) em que o analisador não conseguiu realizar a sua identificação, sendo consideradas células atípicas; eixo dos xx: SSC; eixo dos yy: SFL. No gráfico de dispersão WBC/BASO visualiza-se grande concentração de células resistentes à lise, típico de células neoplásicas; eixo dos xx: SSC; eixo dos yy: FSC. À direita está representada a confirmação de síndrome linfoproliferativa pelo esfregaço sanguíneo corado com Diff-Quik[®]. Visualiza-se uma população de linfócitos atípicos de pequenas e médias dimensões, com núcleo redondo a oval, por vezes indentedo, o citoplasma apresenta (por vezes) cor azul-escura. Ampliação 500x e 1000x. Adaptado de caso de hematologia do L. V. INNO.

O esfregaço de sangue periférico é sobretudo um exame qualitativo que avalia a morfologia das células sanguíneas, mas também permite estimar o seu número percentual. Durante o estágio, a observação microscópica de esfregaço sanguíneo iniciou-se a baixa ampliação (objetiva de 100x), para avaliar a celularidade, a qualidade e o espalhamento da amostra. Nesta objetiva, avaliou-se ainda a presença de auto-aglutinação eritrocitária e leucocitária, agregados plaquetários e estruturas parasitárias (p. ex, microfilárias). De seguida, com recurso a uma ampliação superior (objetiva de 500x), avaliou-se a morfologia dos leucócitos, pesquisaram-se células atípicas (referidas anteriormente) e realizou-se o diferencial leucocitário. Por fim utilizou-se a maior ampliação (objetiva de 1000x) para avaliar a morfologia dos eritrócitos e das plaquetas, realizar a contagem de plaquetas e pesquisar parasitas intracelulares (**Figura 4**)^[5].

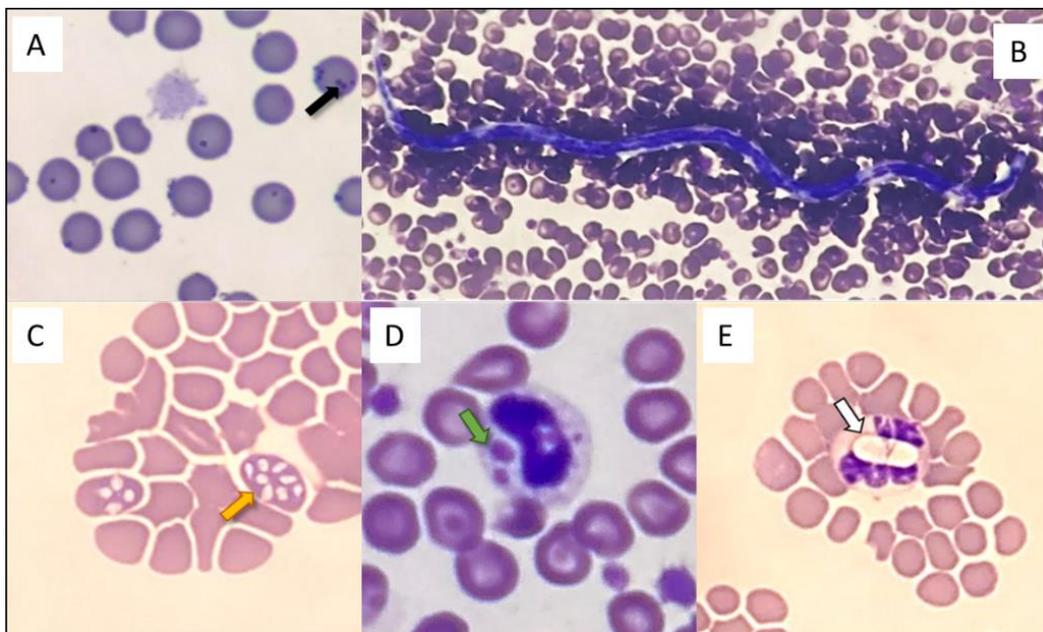


Figura 4 - Fotomicrografias de esfregaços sanguíneos corados com Diff-Quik®, contendo hemoparasitas. (A) Microrganismos compatíveis com *Mycoplasma* spp. (seta preta), ampliação de 1000x. (B) *Microfilária* numa amostra de sangue de canídeo, ampliação 500x. (C) Oito formas intra-eritrocitárias compatíveis com merozoítos de *Babesia* spp. (seta amarela), ampliação de 1000x. (D) Inclusão de Lutz no citoplasma de um monócito canino (seta verde) provocada pelo vírus da esgana, ampliação de 1000x. (E) Microrganismo compatível com *Hepatozoon* spp. no citoplasma de um neutrófilo (seta branca), ampliação de 500x. Adaptado de casos de hematologia do L.V. INNO.

2.2.3.3. Urianálise

Durante o estágio foram preparadas e avaliadas 354 amostras de urina. A “Urianálise tipo I”, a “Urianálise tipo II” (com ou sem determinação do rácio proteína/creatinina urinária) e a avaliação microscópica do “Sedimento Urinário” foram os exames realizados com essa finalidade (**Tabela 2**). A “Urianálise tipo II” foi o exame mais frequente (Fi=139; Fr=39,2%), tanto em canídeos (PIF=43) como em felídeos (PIF=96). De sublinhar que a cultura microbiológica de urina (urocultura) foi integrada na categoria das “Análises microbiológicas”, pelo que a sua contabilização não foi realizada nesta área de diagnóstico laboratorial.

Tabela 2 - Distribuição dos tipos de análises realizadas à urina por espécie animal, expressa por Fi, Fip e Fr (%).

Urianálise	Fip		Fi	Fr (%)
	Canídeos	Felídeos		
Tipo II	43	96	139	39,3
Sedimento Urinário	35	66	101	28,5
Tipo II + rácio UPC	31	45	76	21,5
Tipo I	23	15	38	10,7
Total	132	222	354	100

Rácio proteína/creatinina urinária (UPC).

O exame “Urianálise tipo I” englobou a avaliação das características físicas gerais da urina e o exame semi-quantitativo das suas propriedades químicas. Já a “Urianálise tipo II” além de ter incluído a avaliação das características físicas e químicas da urina, abrangeu também a avaliação microscópica do seu sedimento [6].

Na interpretação dos resultados da urianálise foi tido sempre em consideração o método de colheita da amostra de urina. Os métodos geralmente utilizados para a colheita de urina foram a colheita livre (micção espontânea ou compressão manual da bexiga), a algaliação e a cistocentese. A cistocentese é considerada o método de colheita de eleição para a urianálise e para a cultura microbiológica, porque apresenta menor risco de contaminação da amostra pelo trato urinário distal e genital e é relativamente bem tolerada pelos pacientes [7].

No que diz respeito às propriedades físicas avaliadas na urina, estas incluíram a avaliação da cor, turvação e densidade. Em cães e gatos saudáveis a urina é límpida ou ligeiramente turva e possui cor amarela de várias tonalidades devido à presença de pigmentos naturais (urocromos) [6]. Apesar da intensidade da cor da urina estar geralmente associada à sua concentração (urina mais concentrada é amarela mais escura e vice-versa), esta pode ter inúmeras causas, por isso não deve ser interpretada isoladamente para avaliar a capacidade renal de concentração urinária. Também a presença de pigmentúria (cor anormal) e turvação anormal podem estar associadas à presença de inúmeras substâncias endógenas ou exógenas relacionadas por exemplo com a dieta, o estado de hidratação, administração de fármacos ou hemorragia [6]. Nestes casos, a análise química e o exame microscópico do sedimento foram fundamentais para auxiliar no diagnóstico.

A densidade urinária (USG) reflete a capacidade dos túbulos renais para responder à estimulação da hormona antidiurética, conservar água no organismo e produzir urina bem concentrada [6]. No período de estágio a sua determinação foi feita através de refratometria (método indireto que se baseia no índice de refração da urina). A urina é constituída por 95% de água e 5% de solutos. A quantidade, tamanho e peso desses solutos influenciam fisiologicamente a USG. Já a presença de células, cristais, muco e/ou bactérias sobrestima o seu valor real, porém este problema pode ser evitado se a medição for feita utilizando apenas o sobrenadante após a centrifugação da amostra de urina. A USG deve ser interpretada tendo em consideração a idade e o estado de hidratação do animal, a concentração de proteína e glicose na urina e a concentração de ureia e creatinina séricas. A USG é relativamente insensível na detecção precoce de doença renal. No entanto, num paciente azotémico, ajuda a localizar a sua causa (pré-renal, renal ou pós-renal) [6].

Relativamente à avaliação das propriedades químicas da urina, as tiras reativas foram o método usado durante o estágio para detetar a presença simultânea de vários metabolitos (bilirrubina, glicose, eritrócitos, hemoglobina, corpos cetónicos e proteínas) e o pH. As tiras químicas são constituídas por várias almofadas impregnadas com reagentes que mudam de cor quando a substância de interesse está presente. O grau de mudança de cor corresponde à quantidade aproximada da substância presente [6]. Durante o estágio, esta avaliação foi feita manualmente (comparando as cores da tira com uma escala colorimétrica) ou utilizando um analisador automático, o *Clinitek Status plus*® (Siemens Healthcare, Alemanha). Deve ter-se em conta que o urobilinogénio, os nitritos, a densidade e os leucócitos medidos nas tiras químicas de urina têm pouca relevância clínica em cães e gatos [6].

Por vezes, as tiras químicas de urina podem reagir para a presença de proteína, principalmente a albumina. Caso a reação na tira de urina seja persistentemente positiva em duas ou três amostras de urina colhidas durante 2 semanas, e não existam outras alterações no sedimento, nas proteínas totais séricas, nem sinais clínicos sugestivos de patologia pré-renal ou pós-renal, a medição do rácio UPC é muito útil para avaliar a gravidade da proteinúria renal e determinar a sua origem (glomerular ou tubular) [6]. No L.V. INNO a determinação do rácio UPC é realizada no analisador automático *Cobas® 6000* (módulo c501, *Roche*, Alemanha), mencionado anteriormente.

Na avaliação microscópica do sedimento urinário o principal objetivo é detetar e contabilizar a presença de células (leucócitos, eritrócitos, células epiteliais e células atípicas), cilindros, microrganismos (bactérias, leveduras e fungos) e cristais, podendo indicar a doença do trato urinário subjacente [6]. Para avaliar o sedimento urinário as amostras de urina foram previamente centrifugadas, desprezou-se o sobrenadante e utilizou-se o sedimento remanescente para observação microscópica. O **Gráfico 5** expõe vários processos associados ao sedimento urinário identificados em 175 amostras de urina de 78 felídeos e 97 canídeos. A cristalúria (presença de cristais na urina) constituiu o achado mais frequente (Fi=114), tanto em canídeos (Fip=48) como em felídeos (Fip=66).

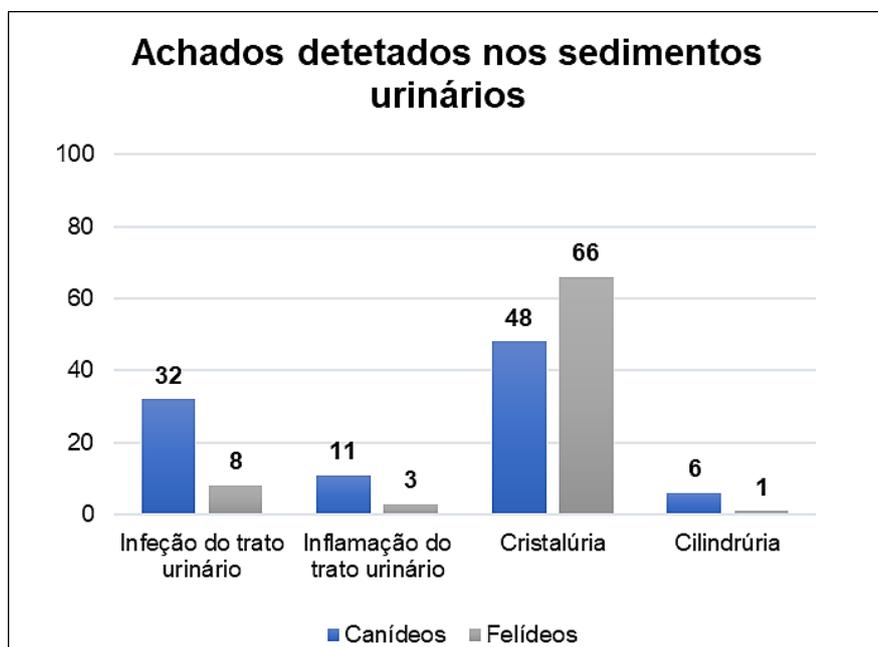


Gráfico 5 - Distribuição dos achados detetados nos sedimentos urinários por espécie animal, expressa por Fip.

A cristalúria ocorre quando a urina está hipersaturada de minerais ou substâncias cristalogénicas que precipitam fora da solução. Em alguns casos, a presença de cristalúria é um achado acidental, sem necessidade de aplicar tratamento. Também não indica necessariamente a presença de urólitos, nem predisposição para a sua formação. No entanto, alguns cristais podem ser patologicamente relevantes em determinadas circunstâncias como, quando são identificados cristais associados a processos patológicos (p. ex., uratos de amónio, oxalato de cálcio monohidratado, cistina) ou quando são encontrados grandes agregados de cristais de estruvite ou de oxalato de cálcio dihidratado [6].

Podemos ver na **Figura 5** alguns exemplos de imagens microscópicas de sedimentos urinários.

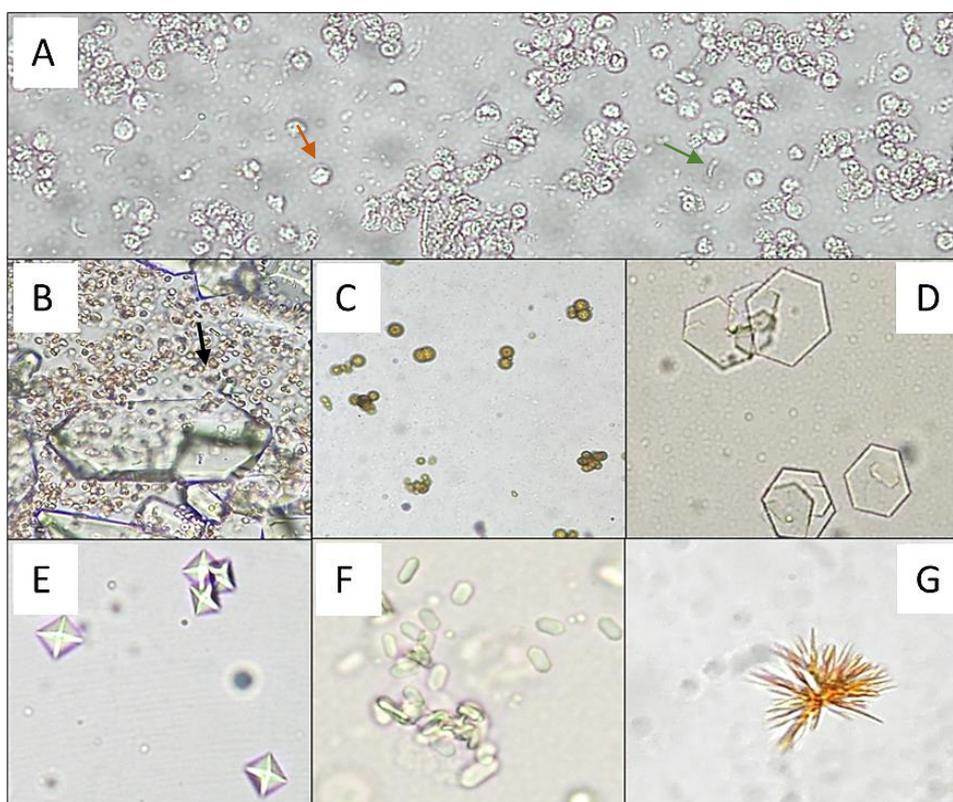


Figura 5 - Fotomicrografias de sedimentos urinários. Ampliação de 400x. (A) Piúria acentuada (abundantes leucócitos, seta vermelha), bacilos (seta verde) e cocos em plano de fundo, compatíveis com infecção do trato urinário. (B) Abundantes eritrócitos e cristais de fosfato de amónio magnésiano (estruvite, seta preta), compatíveis com hematúria e cristalúria. (C) Cristais de uratos de amónio ou xantina. (D) Cristais de cistina. (E) Cristais de oxalato de cálcio dihidratado. (F) Cristais de oxalato de cálcio monohidratado. (G) Cristais de bilirrubina. Adaptado de casos de urianálise do L.V. INNO.

2.2.3.4. Análises microbiológicas

As atividades desenvolvidas durante o estágio na área da microbiologia envolveram a inoculação de diferentes amostras biológicas suspeitas de infecção em meios de crescimento específicos, seguindo-se a sua incubação sob condições ambientais e temporais controladas laboratorialmente. O propósito foi permitir que os agentes patogênicos presentes em tais amostras se pudessem reproduzir e desenvolver de forma fácil e rápida, para posterior detecção, quantificação e identificação.

Nesse sentido, foram acompanhadas 347 análises microbiológicas, de 223 canídeos e 124 felídeos. A urocultura foi a análise microbiológica mais acompanhada para pesquisa de bactérias aeróbicas (Fi=195; Fr=56,2%), seguida pela cultura de exsudados auriculares (Fi=71; Fr=20,4%). A pesquisa de bactérias anaeróbicas foi realizada apenas numa amostra de abscesso de um canídeo (Fi=1; Fr=0,3%) (**Tabela 3**).

Tabela 3 - Distribuição das análises microbiológicas por tipo de amostra e por espécie animal, expressa em Fip, Fi e Fr (%).

Análise	Amostra	Fip		Fi	Fr (%)
		Canídeos	Felídeos		
Pesquisa de bactérias aeróbicas	Urina	105	90	195	56,2
	Exsudado auricular	49	22	71	20,4
	Fezes	3	0	3	0,9
Pesquisa de fungos Dermatófitos	Pelos, crostas e unhas	60	10	70	20,2
Pesquisa de outros fungos	Pelos, crostas e unhas	5	2	7	2,0
Pesquisa de bactérias anaeróbicas	Abcesso	1	0	1	0,3
Total		223	124	347	100

Em 92 das 347 culturas acompanhadas, verificou-se o crescimento de microrganismos, nomeadamente na urocultura, na cultura de exsudados auriculares (EA) e na pesquisa de dermatófitos (DTM) (**Gráfico 6**). A bactéria mais frequentemente identificada na urocultura foi a *Escherichia coli*, isolada em 34 amostras. Na pesquisa de dermatófitos, o fungo *Microsporum canis* foi isolado em duas amostras. A cultura de EA permitiu identificar as bactérias *Staphylococcus pseudintermedius* e *Pseudomonas aeruginosa*, em 16 e 11 amostras respetivamente. A levedura identificada na cultura de EA foi a *Malassezia pachydermatis*, isolada em 17 amostras.

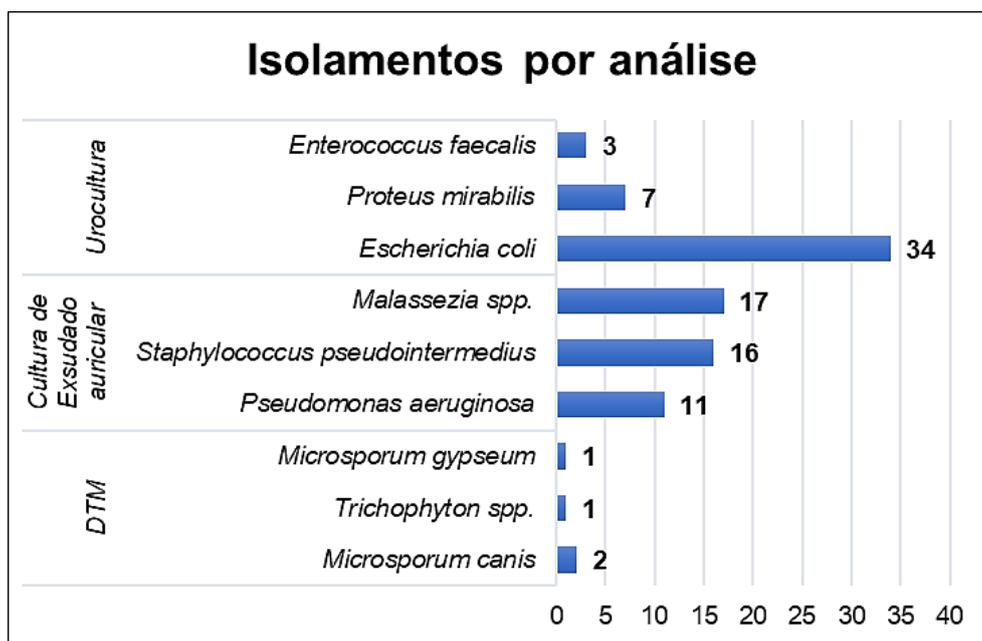


Gráfico 6 - Distribuição dos microrganismos isolados por análise, expressos por Fi.

A cultura bacteriológica de exsudados auriculares está indicada em casos de otite crónica ou recorrente, quando há suspeita de otite média ou quando a terapêutica tópica e/ou sistémica administrada para tratar a otite não mostra ser eficaz. É também indicada quando se observam bacilos na citologia ^[9].

Durante o estágio, as amostras de EA foram incubadas em três meios diferentes: agar *MacConkey*, agar *Columbia* COS (+ 5% sangue ovino) e agar *Columbia* CNA (+ 5% sangue ovino). O meio de cultura agar *MacConkey* é um meio seletivo que isola principalmente bactérias entéricas gram-negativas e bactérias que fermentam a lactose. O meio de cultura agar *Columbia* COS (+ 5% sangue ovino) é um meio geral de nutrição que permite o crescimento de microrganismos fastidiosos e não fastidiosos, tais como *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas spp.*, *Streptococcus spp.*, *Enterococcus spp.*, *Staphylococcus spp.*, corineformes e leveduras. Já o meio de cultura agar *Columbia* CNA (+ 5% sangue ovino) é um meio seletivo que isola principalmente bactérias cocos gram-positivos (especialmente *Staphylococcus spp.* e *Streptococcus spp.*), mas também leveduras. Estes dois últimos meios permitem detectar reações hemolíticas por serem enriquecidos com sangue ^[10].

Antes de ser feita a inoculação, nos meios de cultura referidos anteriormente, foi realizada uma citologia inicial de cada amostra de EA, corada pelo método *Gram*, para identificar a presença de outras estruturas (p. ex., *Malassezia spp.*) (**Figura 6**).

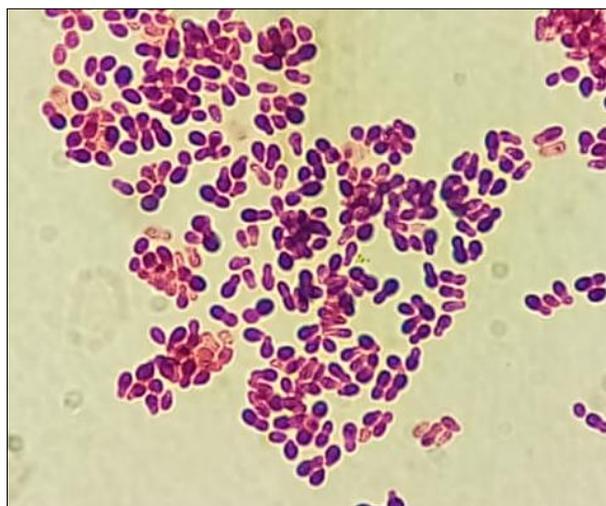


Figura 6 – Fotomicrografia, corada pelo método *Gram*, de microrganismos compatíveis com *Malassezia spp.*, em ampliação 1000x. Adaptado de caso de microbiologia do L.V. INNO.

Após a inoculação das amostras nas placas que contém os meios de culturas, estas foram colocadas na estufa a incubar durante 24 a 48 horas, a temperatura de 37° C. Após este período foi feita a avaliação da existência de crescimento de colônias nas placas. Caso existisse crescimento, o passo seguinte era avaliar visualmente a morfologia da colônia e identificar a presença de hemólise. De seguida, era retirada uma amostra da placa para isolar uma colônia que estivesse em maioria e identificar, através da microscopia, o tipo de bactérias predominantes (cocos, bacilos ou cocobacilos) e se eram *gram*-positivo ou *gram*-negativo.

A determinação dos microrganismos presentes nas amostras de EA foi feita utilizando um equipamento de identificação microbiológica totalmente automatizado, o *VITEK® 2 Compact* (bioMérieux, Inc. Hazelwood, MO) (**Figura 7**). Este sistema utiliza cartas específicas para identificação microbiana e realização de testes de sensibilidade antimicrobiana. Após a inoculação com uma suspensão padronizada do organismo desconhecido, cada carta é incubada e lida pela ótica interna do instrumento. A identificação é realizada através da avaliação de um sinal ótico gerado por reações bioquímicas individuais, presentes nas cartas. A comparação dos resultados com as reações específicas das espécies bacterianas, conhecidas na base de dados do equipamento, permite a identificação dos microrganismos.



Figura 7 - Sistema de identificação microbiológica e realização de testes de sensibilidade antimicrobiana, *VITEK® 2 Compact* (bioMérieux, Inc. Hazelwood, MO). Fotografia original da autora captada durante o estágio no L.V. INNO.

2.2.3.5. Análises parasitológicas

As parasitoses dos animais de companhia, para além de possuírem um impacto negativo na saúde e bem-estar dos mesmos, algumas têm carácter zoonótico, constituindo um perigo para a Saúde Pública. Porém, grande parte das doenças parasitárias podem ser controladas através de um diagnóstico precoce e aplicação de tratamento adequado [11].

Muitos parasitas localizados ao longo do tubo digestivo e órgãos internos produzem ovos, larvas, oocistos ou quistos que são excretados pelo organismo através das fezes [11]. A fim de detetar a presença destes, uma das atividades desenvolvidas durante o período de estágio foi a preparação, visualização e interpretação de 288 amostras coprológicas por dois métodos diferentes: a técnica de *Willis-Molley* modificada e a técnica de *Baermann-Moraes* (**Gráfico 7**). A técnica de *Willis-Molley* modificada foi a análise coprológica mais representativa, tanto na espécie canina (Fip=191) como felina (Fip=75).

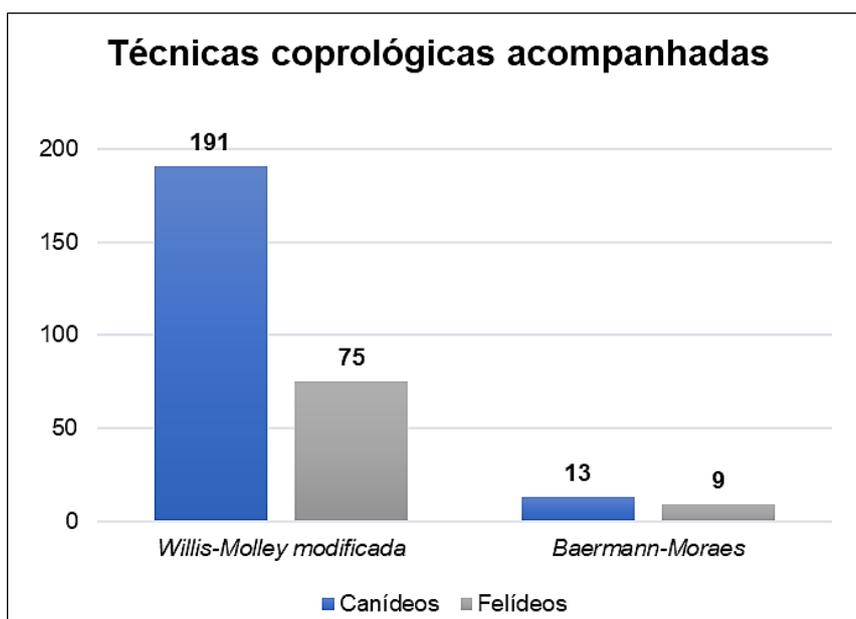


Gráfico 7 - Distribuição das técnicas coprológicas acompanhadas por espécie animal, expressa por Fip.

As análises coprológicas acompanhadas eram constituídas por duas partes: uma avaliação macroscópica das fezes (para observar a cor, consistência, presença de muco, sangue, parasitas adultos e corpos estranhos) e uma avaliação microscópica (para detetar ovos, oocistos, quistos, larvas de parasitas) [11].

Na **Figura 8**, estão representadas algumas das formas parasitárias visualizadas no exame microscópico durante o período de estágio.

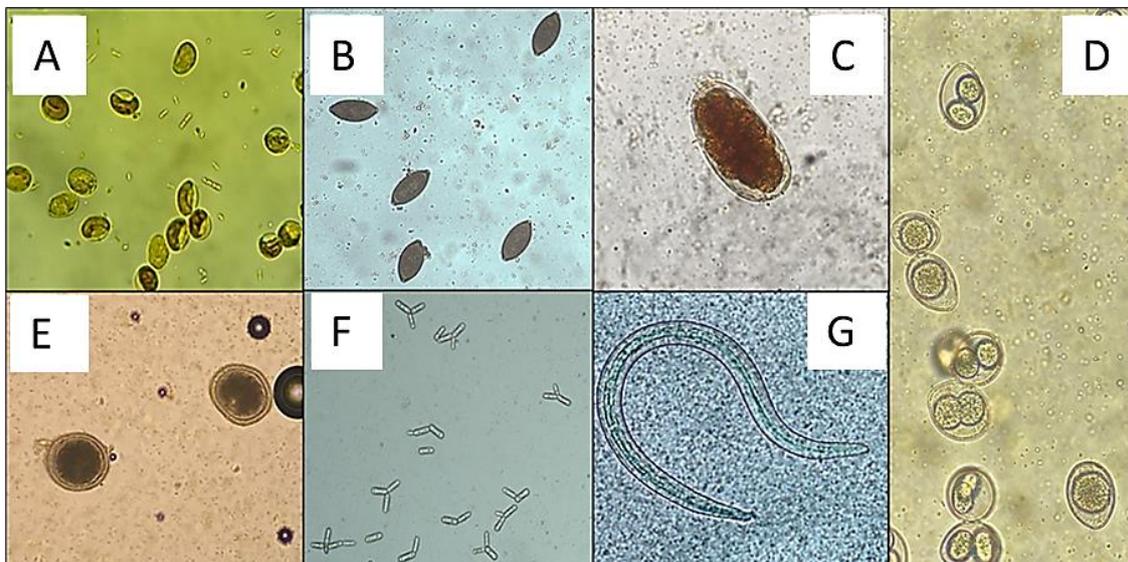


Figura 8 - Fotomicrografias de diversas formas parasitárias detetadas no exame fecal. Ampliação de 400x. (A) Quistos de *Giardia* spp. (B) Ovos de *Trichuris* spp. (C) Ovo de estrôngilo (*Uncinaria* spp., *Ancylostoma* spp.). (D) Oocistos de *Cystoisospora* spp. (E) Ovos de *Toxocara* spp. (F) *Cineclomyces guttulatus*. (G) Larva de *Aelurostrongylus* spp. Adaptado de casos de parasitologia do L.V. INNO.

A técnica de *Willis-Molley* teve como objetivo identificar formas parasitárias (principalmente ovos, oocistos e quistos) do trato gastrointestinal, utilizando como princípio base a flutuação fecal. Para tal foi usada uma solução de densidade elevada de modo que o material parasitário, menos denso que a solução envolvente, pudesse flutuar. Podem ser usadas várias substâncias como soluções de flutuação, nomeadamente: nitrato de sódio, cloreto de sódio, sulfato de magnésio, sulfato de zinco ($ZnSO_4$) e sacarose. É importante ter em conta a densidade da solução utilizada para que exista um equilíbrio entre a quantidade de formas parasitárias e detritos a flutuar, de modo a facilitar a identificação^[11].

Durante estágio foi utilizada uma versão modificada da técnica de *Willis-Molley* com recurso a centrifugação e uso de uma solução de $ZnSO_4$ com densidade de 1.18, uma técnica mais sensível que permite detetar a maioria dos ovos de nematodes, oocistos e quistos de protozoários^[11].

A técnica de *Baermann-Moraes* apresentou como objetivo identificar larvas de parasitas pulmonares. Esta baseia-se no princípio do hidrotropismo e termotropismo positivos. Quando as amostras fecais foram suspensas em água aquecida, se as larvas estivessem presentes,

migravam para fora da amostra pela força da gravidade até ao fundo do sistema, de onde podiam ser recolhidas para identificação ^[11].

A avaliação microscópica das amostras fecais permitiu identificar no total 68 formas parasitárias. Destas, 98,5% corresponderam a parasitas gastrointestinais e apenas 1,5% corresponderam a parasitas pulmonares (**Tabela 4**).

Dos parasitas gastrointestinais, os ovos de *Uncinaria spp.* ou *Ancylostoma spp.* foram as formas detetadas com maior frequência (Fi=18; Fr=26,5%) tendo ocorrido em 15 canídeos e 3 felídeos. As únicas formas parasitárias pulmonares detetadas foram larvas de *Aelurostrongylus spp.*, numa amostra de um felídeo.

Tabela 4 - Distribuição das formas parasitárias detetadas no exame coprológico por espécie animal, expressa por Fip, Fi e Fr (%).

Exame microscópico		Fip		Fi	Fr (%)
		Canídeos	Felídeos		
Nematodes	Ovos de <i>Uncinaria spp.</i> / <i>Ancylostoma spp.</i>	15	3	18	26,5
	Ovos de <i>Toxocara spp.</i>	5	4	9	13,2
	Ovos de <i>Trichuris spp.</i>	3	0	3	4,4
	Larvas de <i>Aelurostrongylus spp.</i>	0	1	1	1,5
Protozoários	Quistos de <i>Giardia spp.</i>	15	1	16	23,5
	Oocistos de <i>Cystoisospora spp.</i>	11	0	11	16,2
Leveduras	<i>Cyniclomyces guttulatus</i>	10	0	10	14,7
Total		59	9	68	100

Giardia spp., é um protozoário flagelado, parasita do intestino delgado, que se encontra distribuído mundialmente. Existem seis espécies que pertencem ao género *Giardia*, das quais a *Giardia duodenalis* (também denominada *G. lamblia* ou *G. intestinalis*) é responsável por infectar vários mamíferos, incluindo cães, gatos e seres humanos. A *G. duodenalis* é atualmente classificada em oito genótipos ou *assemblages* (de A a H), com vários graus de especificidade em relação aos hospedeiros. Os cães são geralmente infectados com os genótipos C e D. O genótipo F é isolado em gatos. Ocasionalmente o genótipo A é detetado em cães e gatos. A infeção humana é quase sempre pelos genótipos A ou B. Assim, pelo facto de cães e gatos possuírem genótipos que podem infectar o ser humano, o potencial zoonótico de *Giardia duodenalis* deve ser considerado ^[11].

Apesar de a maioria das infeções serem assintomáticas, quando ocorrem sinais e sintomas, estes caracterizam-se principalmente por desconforto abdominal a dor abdominal severa, perda de peso, vômitos e diarreia (intermitente ou persistente) ^[11].

Atualmente, o diagnóstico de infeções por *G. duodenalis*, em cães e gatos, através da pesquisa microscópica utilizando técnicas baseadas na flutuação fecal, é um método que apresenta elevada especificidade (cerca de 95,5%). Tipicamente os oocistos são elípticos de parede fina e lisa, contêm dois a quatro núcleos, duas hastes intracitoplasmáticas lineares e dois corpos médios espessos em forma de vírgula. No entanto, a sensibilidade desta análise é limitada por várias razões: 1) os oocistos podem não estar distribuídos homogeneamente por toda a amostra fecal; 2) a sua excreção fecal não é constante; 3) são muito afetados pelas condições de armazenamento da amostra fecal; 4) são afetados pela solução usada na técnica de flutuação. Tendo em conta estes fatores, é de realçar que, a infeção por *G. duodenalis* não deve ser excluída com base num único resultado negativo na flutuação fecal, principalmente se existirem sinais clínicos. Ainda assim, a sensibilidade pode ser melhorada se forem analisadas pelo menos três amostras fecais frescas colhidas num intervalo de três a cinco dias consecutivos e se for usada como solução de flutuação o $ZnSO_4$ com densidade de 1,18. De forma a aumentar a sensibilidade e especificidade do diagnóstico, a *European Scientific Counsel Companion Animal Parasites* recomenda a deteção de coproantígenos de *Giardia duodenalis* juntamente com a realização da flutuação fecal. Existem vários testes disponíveis para detetar os coproantígenos de *Giardia duodenalis*, nomeadamente a imunofluorescência direta, imunocromatografia e ELISA ^{[11] [12]-[14]}.

2.2.3.6. Análises serológicas

Em medicina veterinária estão disponíveis várias provas de diagnóstico que têm como objetivo demonstrar a interação entre antígenos e anticorpos através do doseamento sérico de imunoglobulinas, denominadas na prática por testes serológicos [15].

Nas análises serológicas, o sistema imunitário humoral pode ser explorado para avaliação laboratorial e diagnóstico através de dois modos: 1) os anticorpos podem ser utilizados para identificar o antígeno associado a um agente infeccioso específico e 2) para detectar anticorpos específicos e saber se o animal foi previamente exposto a um agente infeccioso [16].

Durante o período de estágio, foi acompanhada a realização e interpretação de 149 análises serológicas (**Gráfico 8**). O ensaio enzimático de imunoadsorção (ELISA) foi o teste serológico mais frequente, tendo sido realizadas 68 provas, seguido pelo teste de Imunofluorescência indireta (IFI), tendo sido realizados 64 testes.

O teste *Imunocomb*[®] foi realizado em amostras de soro de 10 canídeos, para determinar os níveis de anticorpos (nomeadamente IgM) contra o Parvovírus canino e o vírus da Cinomose canina. O teste de hemaglutinação indireta foi realizado em amostras de soro de 7 felídeos para pesquisa de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii*.

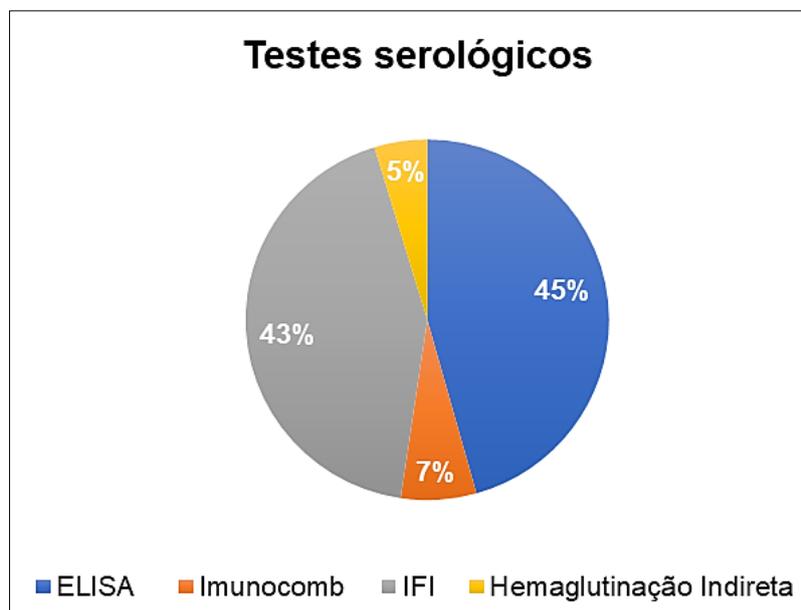


Gráfico 8 - Distribuição dos testes serológicos acompanhados, expressa por Fr (%).

Pode constatar-se pelo **Gráfico 9** que, de entre as provas serológicas mais acompanhadas referidas anteriormente, o ensaio ELISA para pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania infantum*, foi a mais representativa em canídeos (Fi=32). Em felídeos, o ensaio ELISA para pesquisa de antígenos do Vírus da Leucemia Felina (FeLV) foi a prova serológica mais acompanhada (Fi=19).

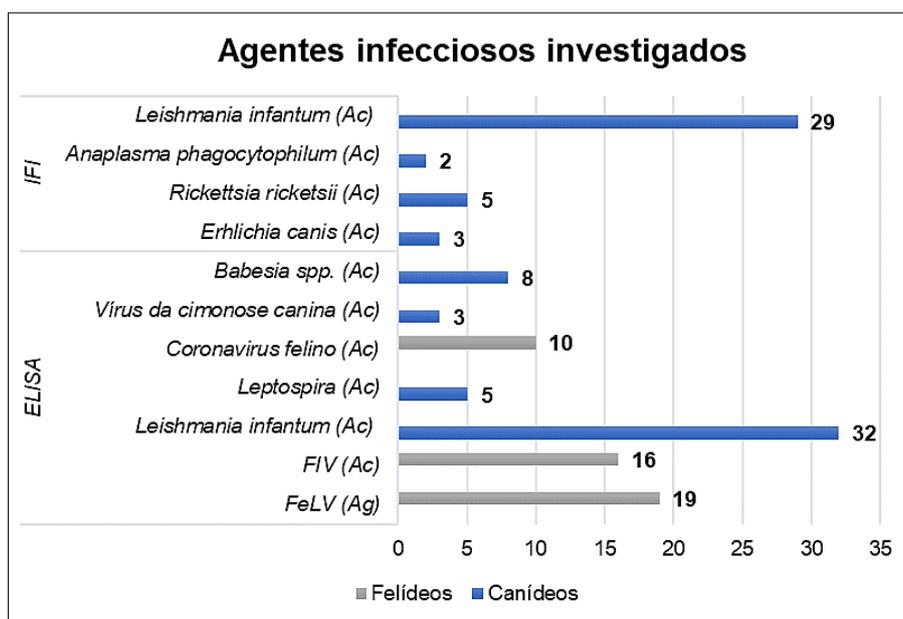


Gráfico 9 - Distribuição dos agentes infecciosos investigados nas provas serológicas IFI e ELISA, por espécie animal, expressa por Fi.

Os ensaios ELISA permitem detetar e quantificar tanto anticorpos (método indireto) como antígenos (método sandwich) séricos. Durante o estágio no L.V. INNO, os ensaios ELISA foram utilizados sobretudo para detetar e quantificar anticorpos em amostras de soro. Para tal, as amostras de soro a serem testadas foram colocadas em placas que continham vários micropoços revestidos com o antígeno específico. Se os anticorpos estivessem presentes na amostra ligar-se-iam especificamente aos antígenos que revestiam os poços. A presença de qualquer anticorpo que se tivesse ligado era detetada ao adicionar uma solução contendo antiglobulinas, quimicamente conjugadas com uma enzima (a peroxidase). Estas ligar-se-iam aos complexos imunes formados e podiam ser detetadas e mensuradas por meio da adição de uma solução, contendo um substrato enzimático, que fazia alterar a cor do meio. A intensidade da cor que se desenvolve é proporcional à quantidade de antiglobulinas conjugadas à enzima que, por sua vez, é proporcional à quantidade de anticorpos presentes no soro analisado^[15]. A intensidade da cor foi estimada visualmente nas placas e também por espectrofotometria.

Durante o estágio, o teste *LeiScan*[®] *leishmania* ELISA (Laboratório Dr. Esteve S.A., Espanha), foi a técnica utilizada para a detecção e quantificação de anticorpos anti-*Leishmania infantum* em canídeos (**Figura 9**).

A leishmaniose canina é uma doença zoonótica causada por protozoários do género *Leishmania*, transmitida por um díptero hematófago, vulgarmente denominado flebótomo. O cão, em áreas endémicas, é considerado o principal reservatório da *Leishmania infantum* ^[17]. A sintomatologia apresenta tipicamente três quadros clínicos - cutâneo, visceral e cutâneo-visceral – com vários graus de severidade. A deteção precoce da doença é um fator primário para obtenção da máxima resposta à terapia, pelo que o rastreio da população com um teste sorológico, como o *LeiScan*[®], é útil para detetar os animais infetados, que ainda se mantêm assintomáticos ou subclínicos. Por outro lado, nos animais infetados que estão a receber tratamento, a realização de análises periódicas a cada 6 meses para determinar o título de anticorpos e sua evolução tem grande utilidade na monitorização da resposta terapêutica.

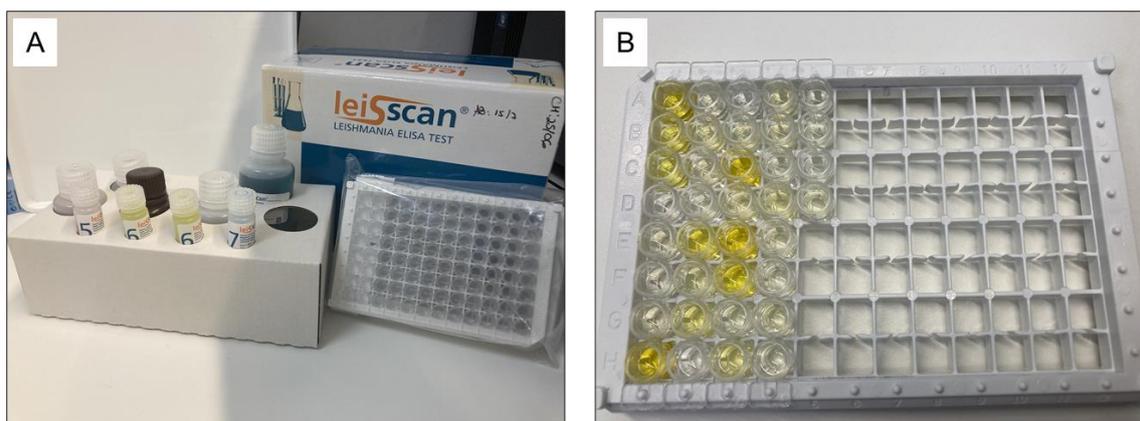


Figura 9 - Em (A) está representado o kit do teste *LeiScan*[®] *leishmania* ELISA (laboratório Dr. Esteve S.A., Barcelona, Espanha). Em (B) está representada a placa com o resultado de um teste *LeiScan*[®]. Os poços de cor amarela correspondem a resultados positivos. Fotografias captadas pela autora durante o estágio no L.V. INNO.

2.2.3.7. Análises endocrinológicas

Relativamente a esta área de diagnóstico laboratorial, foi acompanhada a realização e a interpretação de 84 análises endocrinológicas, as quais permitiram avaliar a função da glândula tiroide (Fi=72; Fr=85,7%), das glândulas adrenais (Fi=8; Fr=11,9%) e a função ovárica (Fi=2; Fr=2,4%) (**Tabela 5**).

O doseamento sérico da tiroxina total (tT4) foi a análise mais frequente com o objetivo de avaliar a função da glândula tiroide (Fi=50; Fr=59,5%), tanto em canídeos (Fip=18), como em felídeos (Fip=32). A avaliação da função das glândulas adrenais foi acompanhada apenas em canídeos, sendo o teste de estimulação com corticotrofina (ACTH) a análise mais frequentemente realizada com esse fim (Fi=6; Fr=7,1%). O doseamento sérico de progesterona (P4) constituiu a análise endócrina acompanhada para avaliar a função ovárica, tendo sido realizada em apenas 2 canídeos.

Tabela 5 - Distribuição dos doseamentos séricos hormonais e testes endócrinos por órgão endócrino e por espécie animal, expressa por Fip, Fi e Fr (%).

Órgão endócrino	Doseamento sérico/ Teste endócrino	Fip		Fi	Fr (%)
		Canídeos	Felídeos		
Glândula tiroide	tT4	18	32	50	59,5
	TSH	9	4	13	15,5
	fT4	4	5	9	10,7
Glândulas adrenais	Estimulação com ACTH	6	0	6	7,1
	Supressão com DBD	2	0	2	2,4
	Rácio Cort/Crea urinário	2	0	2	2,4
Ovários	P4	2	0	2	2,4
Total		43	41	84	100

Tiroxina total (tT4); Tiroxina livre (fT4); Hormona tireoestimulante (TSH); Teste de supressão com doses baixas de dexametasona (DBD); Teste de estimulação com corticotrofina (ACTH); Rácio Cortisol/Creatinina urinário (Rácio Cort/Crea); Progesterona (P4).

As análises endocrinológicas acompanhadas foram processadas de forma automática no analisador *Immulite 2000*[®] (*Siemens Healthcare*, Alemanha), em amostras de soro ou urina. Através de reações de quimiluminescência altamente sensíveis, este analisador permitiu determinar a concentração sérica das hormonas presentes nas amostras a analisar pela deteção de uma reação de ligação antigénio-anticorpo. A hormona a quantificar é marcada enzimaticamente e, a quantidade da hormona marcada que se liga aos anticorpos, é detetada através da adição de um substrato quimiluminescente, que é posteriormente lido por um contador de fotões ^[18].

Dos 84 exames endócrinos acompanhados, 15 apresentaram variações em relação aos intervalos de referência estabelecidos pelo L.V. INNO (**Tabela 6**), os quais permitiram suspeitar de doenças associadas à glândula tiroide (nomeadamente o hipertiroidismo e hipotiroidismo) e às glândulas adrenais (nomeadamente o hiperadrenocorticismo). O hipertiroidismo felino (HTF) constituiu a doença endócrina mais frequente (Fr=40%). Nos canídeos, o hipotiroidismo foi a doença endócrina com maior representatividade (Fr=26,7%), tendo-se verificado resultados compatíveis com a mesma em 4 pacientes, na casuística acompanhada.

A exclusão ou confirmação das referidas doenças foi realizada com base na interpretação do resultado das análises endocrinológicas referidas (doseamento sérico hormonal ou teste endócrino específico) em conjunto com informação clínica sobre o paciente (disponibilizada na ficha de requisição da análise) e o resultado de outros exames auxiliares de diagnóstico (p. ex., hematologia, bioquímica sérica e imagiologia).

Tabela 6 - Distribuição das doenças endócrinas suspeitas por doseamento sérico hormonal e por espécie animal, expressa por Fip, Fi e Fr (%).

Doença endócrina	Doseamento sérico	Fip		Fi	Fr (%)
		Canídeos	Felídeos		
Hipertiroidismo	tT4	0	5	5	33,3
	tT4 + fT4	0	1	1	6,7
Hipotiroidismo	tT4 + TSH	4	0	4	26,7
Hiperadrenocorticismo	Teste estimulação ACTH	3	0	3	20
	Teste de supressão DDB	2	0	2	13,3
Total		9	6	15	100

Tiroxina total (tT4); Tiroxina livre (fT4); Hormona tireoestimulante (TSH); Teste de estimulação com corticotrofina (ACTH); Teste de supressão com doses baixas de dexametasona (DDB)

O hipertiroidismo felino (HTF) ou tirotoxicose felina é a patologia endócrina mais comum em gatos adultos e geriátricos, sendo predominantemente diagnosticada em pacientes com mais de 10 anos. A sua confirmação requer a avaliação laboratorial das hormonas tiroideias, sobretudo tT4 e fT4. O teste laboratorial *gold standard* continua a ser a medição da concentração basal sérica de tT4, uma vez que está aumentada em 90% dos casos. A medição de T3, hormona tiroideia biologicamente mais ativa, é raramente útil para o diagnóstico, uma vez que está dentro dos valores de referência em 25 a 30% dos gatos com hipertiroidismo. Também a TSH tem utilidade diagnóstica limitada porque está quase sempre diminuída nos gatos com hipertiroidismo [18].

A medição da concentração de tT4, tem elevada sensibilidade e especificidade no diagnóstico de HTF. No entanto, cerca de 10 % dos pacientes podem apresentar a concentração de tT4 dentro do intervalo de referência (geralmente na metade superior do intervalo), se estiverem nas fases iniciais da doença ou se possuírem uma doença não tiroideia concomitante. Por isso, o diagnóstico não pode ser excluído com base numa única medição normal de tT4. Se os sinais característicos da doença estiverem presentes, a abordagem mais adequada é repetir novamente a tT4, cerca de duas a quatro semanas depois [18].

O doseamento sérico de fT4 pode auxiliar o diagnóstico nos casos em que a concentração de tT4 está dentro do intervalo de referência e a apresentação clínica do paciente é sugestiva, uma vez que mais de 95% dos gatos com hipertiroidismo e valores de tT4 dentro do intervalo de referência, apresentam concentrações de fT4 elevadas. Apesar do seu doseamento ser mais sensível do que o doseamento de tT4, a sua especificidade é relativamente baixa uma vez a sua concentração pode estar falsamente aumentada em animais saudáveis e animais com doença não tiroideia. Assim, a sua interpretação deve ser sempre realizada em conjunto com os valores da concentração de tT4. Concentrações de tT4, no limite superior do intervalo de referência e fT4 aumentada, são concordantes com HTF. Pelo contrário, concentrações de tT4 no limite inferior do intervalo de referência e fT4 aumentada estão normalmente associadas a patologia não tiroideia [18], [19].

2.2.3.8. Análises citológicas - citologia de efusões

De entre o leque de análises laboratoriais assistidas/efetuadas, as análises citológicas integraram um pequeno volume de todo o trabalho acompanhado diariamente no decorrer do estágio curricular. Por ter sido a mais representativa, justificou-se incluir apenas a análise citológica das efusões cavitárias nesta área de diagnóstico laboratorial.

A partir da informação apresentada pelo **Gráfico 10**, constata-se que foram acompanhadas 33 análises de efusões. O transudado modificado foi o tipo de efusão mais frequente em felídeos, tendo ocorrido em 11 animais (Fr=33,3%), enquanto o exsudado não séptico foi a mais frequente em canídeos, tendo sucedido em sete animais (Fr=21,2%).

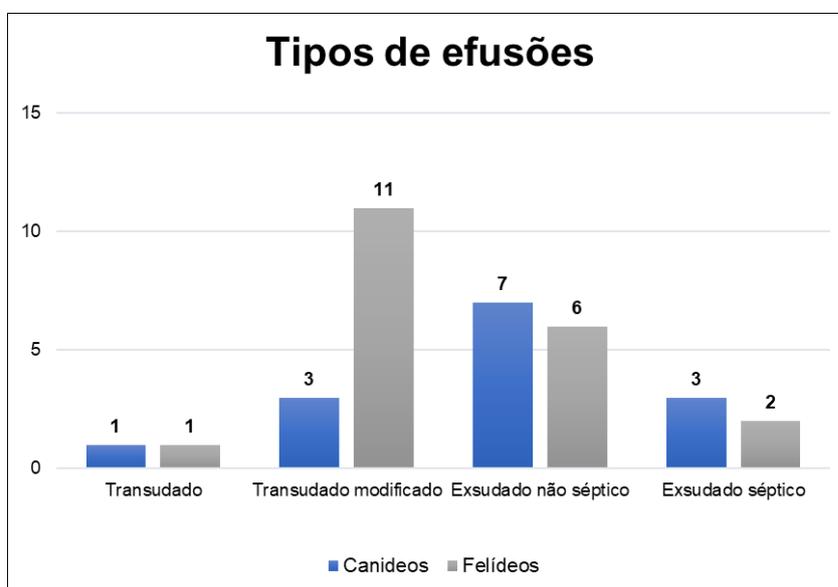


Gráfico 10 - Distribuição dos tipos de efusões cavitárias acompanhadas por espécie animal, expressa em Fi.

As efusões correspondem a acumulações anormais de fluido dentro das cavidades corporais (pleural, peritoneal e/ou pericárdica). São um achado não específico associado a uma variedade de processos patológicos, tendo etiologia multifatorial.

A sua recolha e avaliação são, por isso, fundamentais para perceber qual o mecanismo subjacente ao seu aparecimento. Durante o estágio, a análise das efusões incluiu três vertentes principais: a análise bioquímica (determinação do conteúdo proteico), contagem celular e exame citológico. Através da análise citológica das efusões foi possível avaliar as características morfológicas das células e verificar a presença ou ausência de microrganismos, o que pôde proporcionar diagnósticos mais específicos.

3. Peritonite Infeciosa Felina: Revisão Bibliográfica

3.1. Caracterização do Coronavírus felino

Os coronavírus pertencem à família *Coronaviridae*, a qual faz parte da ordem *Nidovirales*. Esta família inclui ainda a subfamília *Coronavirinae*, que se encontra dividida em quatro géneros: *Alpha-*, *Beta-*, *Gamma-* e *Delta-coronavirus*. Os *Alfa-* e *Beta-coronavirus* são originários de morcegos e infetam predominantemente mamíferos. Os *Gama-* e *Delta-coronavirus* são originários de aves e suínos, sendo capazes de infetar tanto aves como mamíferos [21]. Dentro do género *Alpha-coronavirus*, os Coronavírus Felinos (FeCoVs) fazem parte da espécie *Alpha-coronavirus* I, contendo também outros vírus intimamente relacionados, como os Coronavírus Caninos (CaCoVs) e o vírus da Gastroenterite Transmissível Porcina (TGEV) [22]. A síndrome respiratória aguda grave – coronavírus dois (SARS-CoV-2), pertencente ao género *Beta-coronavirus*, diferindo da infeção por FeCoV [23].

Os FeCoVs existem em dois biótipos distintos, o Coronavírus Entérico Felino (FECV) e o vírus da Peritonite Infeciosa Felina (PIFV). O primeiro é muito contagioso, infeta os enterócitos e causa maioritariamente uma doença subclínica ou ligeira. O segundo, infecta monócitos e macrófagos e causa doença multisistémica severa, com alta taxa de mortalidade. Embora ainda não existam provas definitivas para entender a transição entre ambos, acredita-se que a origem do biótipo PIFV resulte de mutações espontâneas no genoma do FECV, que lhe confere uma mudança no tropismo celular [23], [24]. Contudo, o comportamento dicotómico entre FECV e PIFV tem sido questionado e existem provas da existência de “FeCoVs” sistémicos que não são “FECVs”, mas que também não causam Peritonite Infeciosa Felina (PIF), portanto não podem ser considerados como PIFV, contribuindo para a diversidade de FeCoVs e refutando o conceito da mudança direta de FECV para PIFV [23] [24].

Com base nas suas propriedades antigénicas, os FeCoVs são classificados em dois serótipos distintos: o felino (serótipo I) e o canino (serótipo II). Esta classificação foi estabelecida pela caracterização de anticorpos específicos contra a proteína da espícula dos FeCoVs e dos CaCoV. Os FeCoVs do serótipo II surgem através de uma recombinação homóloga entre os CaCoV e o serótipo I dos FeCoVs, em gatos infetados com ambos. Como consequência desta recombinação ocorre a integração do gene que codifica a proteína da espícula dos CaCoVs no serótipo I dos FeCoVs, conferindo aos dois serótipos propriedades antigénicas diferentes. Ambos os serótipos estão presentes nos biótipos (FECV e PIFV) e ambos podem causar PIF. Os vírus do serótipo I são muito mais predominantes nas populações de gatos, sendo por isso a principal causa da PIF [25].

3.2. Genoma viral

O genoma dos FeCoVs contém uma única molécula de ácido ribonucleico (RNA) linear e de sentido positivo, cujo comprimento varia entre 27,6 e 30 quilobases (kb), aproximadamente o triplo do tamanho do genoma dos retrovírus [23].

Tal como mostra a **Figura 10**, o genoma dos FeCoVs é composto por uma extremidade 5' e uma extremidade 3'. Os primeiros dois terços da extremidade 5', que correspondem a aproximadamente 20 kb, abrangem dois grandes quadros de leitura abertos (ORFs), 1a e 1b. A tradução dos genes presentes nas referidas ORFs, origina as poliproteínas replicases 1a e 1ab. Estas poliproteínas são posteriormente extensivamente clivadas por proteases virais dando origem a dezasseis proteínas não estruturais funcionais. No último terço do genoma, próximo da extremidade 3', existem nove ORFs, onde ocorre a tradução dos genes que codificam as proteínas estruturais (S, E, M e N) e as proteínas acessórias (3a, 3b, 3c, 7a e 7b) [21], [23], [24].

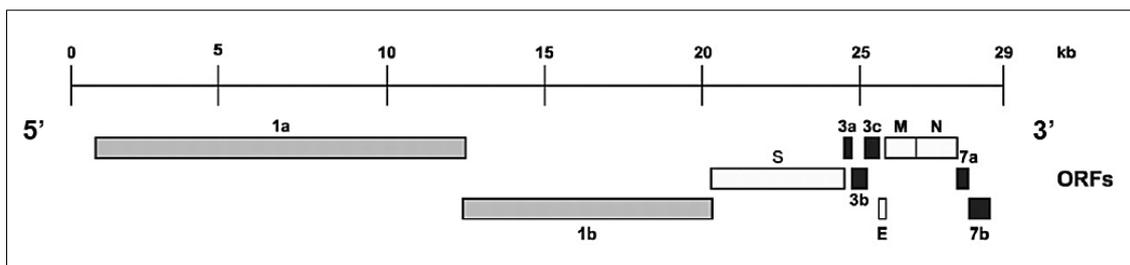


Figura 10 - Organização esquemática do genoma dos FeCoVs. ORFs 1a e 1b (retângulos cinzentos); ORFs S, M, E e N (retângulos brancos); ORFs 3a, 3b, 3c, 7a, 7b (retângulos pretos). Adaptado de Tekes & Thiel (2016) [22].

3.3. Estrutura e proteínas virais

Geralmente os FeCoVs possuem uma forma esférica, dimensões que variam entre 80 e 120 nanômetros de diâmetro e são revestidos por um envelope lipídico derivado da célula hospedeira. A este envelope estão ancoradas as proteínas estruturais da espícula (S), do envelope (E) e da membrana (M) [21], [23]. A proteína estrutural da nucleocápside (N) está atracada ao material genético viral (**Figura 11**). De modo geral estas proteínas são responsáveis pela montagem do virião, proteção do material genético viral e pela infecção das células-alvo [23]-[25].

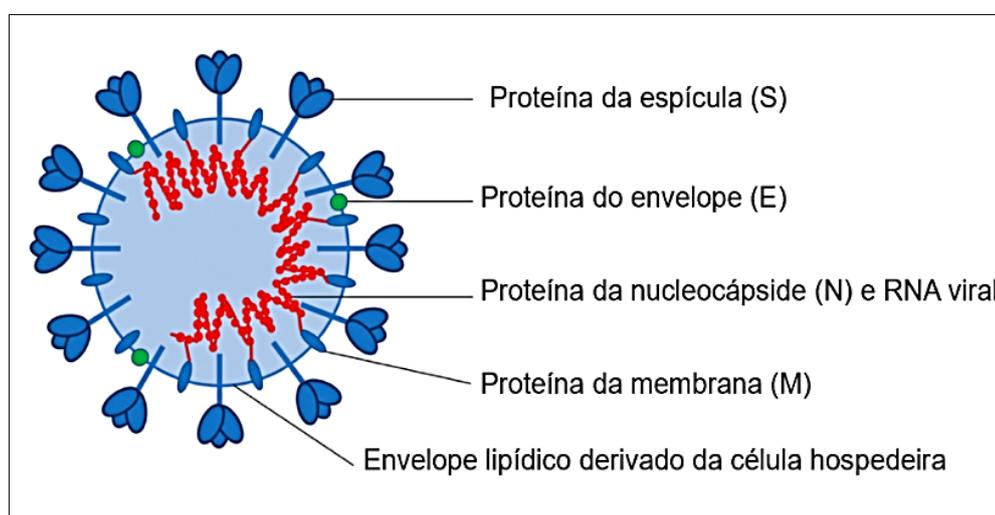


Figura 11 - Representação esquemática das proteínas estruturais dos FeCoVs. Adaptado de Haake et al (2020) [23].

A proteína S é conhecida por ser a principal reguladora da entrada dos FeCoVs nas células-alvo e o principal elemento antigénico viral. Forma espículas claviformes que se projetam na superfície do virião, conferindo aos mesmos a forma de coroa, a que se deve o nome da família a que pertencem (coroa, do latim *corona*). É uma proteína com aproximadamente 200 kilodaltons, composta por três domínios: ectodomínio (contém a maioria dos elementos funcionais para ligar o virião ao recetor da célula hospedeira e induzir a fusão das membranas viral e celular); domínio transmembranar e endodomínio (uma porção terminal curta) [24], [25].

Dentro do ectodomínio (**Figura 12**) existem duas subunidades funcionais básicas, S1 e S2. Na S1 está o domínio de ligação ao recetor da célula-alvo. Na S2 está o peptídeo de fusão (PF), o principal elemento regulador da ligação do virão à membrana das células-alvo [24], [25].

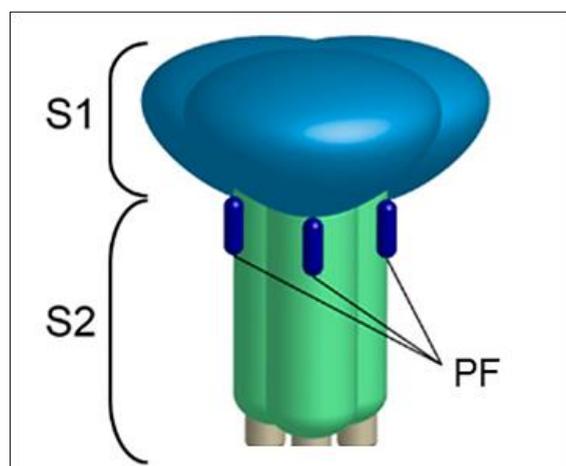


Figura 12 - Representação esquemática do ectodomínio da proteína da espícula. Adaptado de Jaimes et al (2020) [24].

Os FeCoVs possuem ainda dezasseis proteínas não estruturais, as quais resultam da clivagem das poliproteínas replicases 1a e 1ab, mencionadas anteriormente, pelas proteases virais *Papain-like* e *Chymotrypsin-like cysteine* (também denominada Protéase principal). Estes produtos de clivagem, juntamente com outras enzimas, particularmente a RNA dependente de RNA polimerase, formam os complexos de replicação-transcrição virais, localizados no citoplasma da célula infetada, que reúnem as condições para a síntese de RNA genómico e das proteínas estruturais [22] [21].

Os FeCoVs possuem também cinco proteínas acessórias, nomeadamente as 3a, 3b, 3c, 7a e 7b. Embora as funções da maioria das proteínas acessórias permaneçam mal compreendidas e possam ser dispensáveis para a replicação do vírus *in vitro*, algumas parecem aumentar a sua virulência *in vivo* [23].

3.4. Epidemiologia

3.4.1. Prevalência

Com exceção de algumas ilhas (p. ex., as Ilhas Malvinas na América do Sul), a infecção por FeCoV encontra-se distribuída mundialmente, estando presente em praticamente todas as populações de gatos ^[26] ^[27].

Aproximadamente 20 a 60% dos gatos domésticos possuem anticorpos séricos anti-FeCoV, podendo esta taxa chegar até próximo dos 100% em ambientes onde vivem vários gatos. Apesar destes valores refletirem taxas de infecção viral elevadas, a síndrome fatal da PIF apenas se desenvolve em aproximadamente sete a 14% dos gatos infetados com FeCoV ^[22] ^[27].

Atualmente estão reportadas seroprevalências elevadas de infecção na Áustria (84%), na Alemanha (78%) e no Japão (66,7%). Enquanto seroprevalências mais baixas são detetadas em Taiwan (28,2%) e Reino Unido (25,6%) e na Coreia (13,7%) ^[27]-^[30].

O serótipo I é responsável por cerca de 80 a 95% das infecções naturais que ocorrem nos continentes europeu e americano. Já o serótipo II é mais prevalente no continente asiático, sendo responsável por até 25% das infecções naturais nessa região ^[22].

Até ao momento, o único estudo realizado em Portugal sobre a distribuição dos serotipos I e II na população de gatos domésticos, mostrou que nos gatos com PIF, o serotipo I estava presente em 79% dos casos e o serotipo II estava presente em apenas 3,5%. Nos restantes 17,5% dos casos não foi possível determinar qual o serotipo presente ^[31].

Além de infetarem felinos domésticos, os FeCoVs também podem acometer felídeos silvestres e selvagens em todo o mundo, em particular os que vivem em parques zoológicos. Foram descritas infecções em leões africanos, pumas, leopardos, chitas, jaguares, lincos, servais, caracais, gatos selvagem europeus e gatos do deserto ^[23].

3.4.2. Fatores de risco

Existem alguns fatores relacionados com os organismos hospedeiros que aumentam o risco de infecção por FeCoV e, por conseguinte, o desenvolvimento da PIF. Estes incluem: a idade, o *stress*, a presença de doenças concomitantes, o género, o estado reprodutivo, a raça e o número de gatos que convivem no mesmo espaço (densidade populacional).

Em relação à idade, embora gatos de qualquer idade sejam suscetíveis ao desenvolvimento da PIF, esta doença acomete sobretudo gatos jovens até aos 3 anos ^[32]. Pensa-se que tal facto possa estar associado aos gatinhos deixarem de estar protegidos pelo colostro e leite da progenitora a partir das 10 semanas de idade, pois a transferência de imunoglobulinas maternas é suficiente para impedir a infecção até esse período. À medida que a imunidade passiva enfraquece, o risco de infecção aumenta porque o sistema imunitário, ainda imaturo, não consegue produzir uma resposta humoral ativa e eficaz. Nesta altura, caso os gatinhos estejam infetados por FeCoV, a infecção é controlada principalmente pela imunidade celular. No entanto, quando acometidos por situações de *stress* ou doenças que comprometam tal resposta imunitária os gatinhos podem desenvolver PIF ^[33].

O *stress* está ligado à imunossupressão, que resulta numa maior vulnerabilidade à ocorrência de várias doenças infecciosas, por isso pode aumentar o risco de um gato infetado com FeCoV desenvolver PIF. É importante evitar situações de *stress* tais como mudanças de ambiente, o transporte, introdução de novos animais, grande densidade de animais confinada num pequeno espaço, ações de vacinação em ambiente stressante ou cirurgias ^[34].

A PIF correlaciona-se com a densidade de gatos alojados juntos. Quanto maior o número que animais que partilham o mesmo espaço, maior probabilidade de exposição a cargas virais de FeCoV mais elevadas. Estima-se que o risco de exposição a FeCoV seja cinco vezes superior quando vários gatos que vivem no mesmo ambiente durante mais de 60 dias ^[34].

A PIF apresenta interações com outros agentes infecciosos. O estudo de *Aydin et al* (2019) demonstrou que, infeções concomitantes pelo Vírus da Imunodeficiência Felina (FIV) e pelo Vírus da Leucemia Felina (FeLV) são um fator predisponente para o desenvolvimento de PIF, em gatos infetados com FeCoV, e para a progressão da doença em gatos com PIF. Esta evidência está provavelmente relacionada com a diminuição da resposta imunitária, tanto da resposta humoral como celular provocada por estes vírus ^[36].

A imunossupressão decorrente da idade, do *stress* e/ou de doenças, poderá facilitar a transição entre biótipos de FeCoV, devido à diminuição da capacidade de combater o vírus, o que leva ao aumento da sua taxa de replicação e, por conseguinte, ao aumento do risco de mutações ^[34] ^[36].

Alguns estudos demonstram a existência de uma relação entre o risco do desenvolvimento de PIF e a raça, afirmando ainda que algumas raças de felinos apresentam risco mais elevado que outras ^[37]. Contudo, o desenvolvimento do PIF está provavelmente mais relacionado com as linhas genéticas dentro de uma raça do que com as próprias raças ^[34]. O envolvimento da raça pode ser explicado pelo facto de os animais serem provenientes de gatis de reprodução (ambientes com múltiplos gatos), aumentando o risco de exposição ao FeCoV. O aumento da prevalência que se encontra em determinadas raças, indica que pode haver um componente genético relacionado com a resposta imunitária, particularmente se os gatos pertencerem a populações com polimorfismo genético limitado ou devido à concentração de fatores hereditários através de cruzamentos consanguíneos ^[37]. Em contraste, *Riemer et al* (2016), demonstraram não haver relação significativa entre a raça e o desenvolvimento da PIF ^[32].

Em relação ao género está descrito que gatos machos e animais inteiros apresentam uma maior predisposição para desenvolver PIF ^[32] ^[37]. O facto dos machos mostrarem maior suscetibilidade ao desenvolvimento da PIF poderá estar relacionado com a influência dos androgénios, na imunidade mediada pelas células, afetando negativamente a função dos linfócitos T ^[32] ^[37]. A ocorrência da PIF em animais inteiros pode ser explicada por duas razões: os animais inteiros são normalmente mais jovens do que os gatos castrados; a presença de animais inteiros na população de gatos de raça que são usados para reprodução e são castrados mais tarde ^[32] ^[37].

3.4.3. Transmissão, infecção e excreção viral

Relativamente à transmissão, o FeCoV é um vírus muito contagioso e a sua transmissão é frequentemente indireta, através do contacto oro-nasal dos gatos com fezes contaminadas ^[38]. Outra possível fonte de transmissão são as fomites, por exemplo através de materiais usados para higienizar os animais, roupas ou calçado, uma vez que o FeCoV possui capacidade de sobrevivência até sete semanas em ambientes secos ^[38]. Ainda que a partilha de tigelas de alimentação ou o *grooming* não constituam fontes de transmissão consideráveis, porque o FeCoV raramente foi detetado na saliva dos gatos, estas fontes não devem ser descartadas ^[38]. Recentemente um estudo relatou um caso de rinite associada a PIF, o que sugere que o trato respiratório pode ser um local para a transmissão de FeCoV ^[39]. A transmissão de FeCoV através da transfusão sanguínea não foi reportada ^[38].

Após a infecção natural com FeCoV, os gatos começam a excretar o vírus nas fezes ao fim dois ou três dias e podem excretar o agente nas fezes de forma relativamente consistente durante longos períodos de tempo (cerca de 10% a 15% dos gatos infetados), ou podem excretar o vírus de forma intermitente (cerca de 70% a 80% dos gatos infetados), ou podem ainda, não excretar o vírus (menos de 5% dos gatos infetados). Assim, na maior parte das infeções naturais por FeCoV, os gatos começam a excretar o vírus nas suas fezes até conseguirem limitar a infecção e parar a excreção. Ao reinfectarem-se começam a excretar o vírus novamente ^[34].

Em casos de infecção pelo FeCoV do serótipo I, a excreção persiste durante semanas a meses. Em contraste, nas infeções pelo serótipo II, o período de excreção é desconhecido, mas com base em estudos experimentais, pensa-se que seja cerca de 2 semanas ^[40].

Uma vez que a grande maioria dos gatos infetados com FeCoV não apresenta sintomatologia, mas liberta o vírus nas suas fezes, estes desempenham um papel central na transmissão e manutenção do vírus nas populações de gatos e, portanto, representam uma ameaça para outros animais, especialmente nos que vivem em ambientes com vários gatos ^[22].
^[23].

3.5. Fisiopatologia

Apesar dos vários estudos realizados até à data, os mecanismos exatos que regem a patogénese da PIF permanecem desconhecidos. O que se sabe é que o FeCoV mostra ter tropismo para as células do epitélio intestinal (biótipo FECV) mas também é capaz de infetar macrófagos e monócitos, embora ineficientemente (FeCoV sistémico). Já o PIFV mostra infetar e replicar-se de forma eficiente e exclusiva em macrófagos e monócitos. Deste modo, a alteração do tropismo viral dos enterócitos para os monócitos e macrófagos parece ser essencial para ocorrer a PIF. Além disso, a semelhança genética entre os biótipos FECV e PIFV, a baixa incidência de PIF e elevada seropositividade de FeCoV, levou à hipótese de o biótipo PIFV ter origem no biótipo FECV ^[41].

3.5.1. Forma avirulenta – FeCoV nos enterócitos

Após entrar no organismo do hospedeiro, ao nível do intestino, o FECV penetra nas células epiteliais das pequenas vilosidades intestinais, nas quais inicia a sua replicação ^[42] ^[43].

A fase inicial da infeção intestinal, ocorre sobretudo associada à presença de elevados níveis de replicação viral desde a parte caudal do duodeno até ao ceco. Em infeções crónicas e persistentes, a replicação viral é restrita ao intestino grosso, sendo os níveis mais elevados de replicação viral detetados no colón ^[42] ^[43].

Habitualmente a infeção pelo biótipo FECV não está associada a sinais clínicos. Contudo ocasionalmente pode ser acompanhada por enterite ligeira e, muito raramente enterite severa e fatal ^[22].

3.5.2. Forma virulenta – Aquisição de tropismo para os monócitos/macrófagos

Um pré-requisito essencial para o aparecimento do PIFV prende-se com a capacidade do FeCoV se replicar de forma eficiente e sustentada nos monócitos ^[25]. Os vírus com genoma de RNA são inevitavelmente mutáveis. As mutações ocorrem à medida que os vírus se replicam e copiam o seu material genético, porque a polimerase viral é propensa a erros e carece de capacidade de revisão. Assim, quanto mais um vírus se replica, mais provável é surgirem mutações. Deste modo, infeções crónicas e persistentes, típicas de FeCoV, com replicação contínua do vírus, criam condições ótimas para que estas mutações ocorram ^[35].

O local exato no organismo onde as mutações ocorrem é atualmente desconhecido, mas é provável que aconteçam algures entre os enterócitos, os macrófagos teciduais e monócitos sanguíneos [35].

Existem atualmente três teorias que tentam explicar a mudança do biótipo FECV para o biótipo PIFV e, por sua vez, a mudança de tropismo viral: a teoria da mutação interna (a mais predominantemente aceite), a teoria da circulação de estirpes virulentas e avirulentas e a teoria das quasispécies [41] [44].

Segundo a teoria da mutação interna, o biótipo PIFV tem origem numa ou várias mutações que ocorrem no biótipo FECV. Pensa-se que estas mutações ocorram em animais cuja resposta imunitária não seja suficientemente eficiente para parar a replicação viral, como é o caso de gatos muito jovens e imunodeprimidos [41].

Estão descritas mutações nas sequências nucleotídicas da proteína estrutural S. A primeira mutação foi uma substituição, descrita por *Chang et al* (2010), que detetaram duas diferenças de aminoácidos no domínio que codifica o peptídeo de fusão da referida proteína, denominadas M1058L e S1060A (nomenclatura baseada na posição e na natureza da mudança de aminoácidos), ou seja, a metionina foi substituída pela leucina na posição 1058 e a serina foi substituída pela alanina na posição 1060 [45]. Neste estudo, as mutações foram observadas em 96% de amostras de tecidos infetados e não nas fezes, fornecendo fortes evidências de que estas mutações se relacionam com a ocorrência da doença [45]. Mais tarde, *Porter et al.* (2014) sequenciaram um pequeno fragmento do gene da proteína S proveniente de amostras fecais e de tecidos de gatos com FECV e PIFV. Na maioria das amostras fecais, os autores encontraram a metionina na posição 1058 e na maioria das amostras de tecido leucina na posição 1058, independentemente de os gatos terem sido infetados com FECV ou FIPV. Concluíram assim que tal substituição representa um marcador para a infeção sistémica de FeCoV e não um marcador para FIP [46].

Licitra et al (2013) detetaram outra mutação no local da clivagem da proteína S, entre o domínio de ligação ao recetor (S1) e o domínio de fusão (S2). Neste estudo, todos os FeCoV apresentavam um local de clivagem conservado enquanto na maioria dos PIFV foi encontrado pelo menos uma substituição [47].

Um estudo publicado por *Pedersen et al* (2012) mostrou que os gatos infetados com FeCoV contêm o gene 3c intacto, enquanto os gatos com PIFV contêm mutações que impedem a tradução de uma proteína 3c funcional. Portanto, as mutações em 3c foram inicialmente consideradas como um marcador de virulência e indicativo da PIF [48]. Estudos posteriores concluíram que, para a replicação do FECV ocorrer no intestino, a presença de uma proteína 3c funcional é crucial, mas nem todas as amostras com PIFV possuíam o gene 3c mutado. Por isso, as mutações no gene 3c não são causa única da mudança do biótipo, mas sim uma consequência da propagação sistémica e da replicação melhorada dos FeCoVs [22]

No entanto, não se pode excluir que as mutações que afetam a expressão da proteína 3c contribuam para uma maior aptidão viral nos monócitos e macrófagos e, assim, para o desenvolvimento de PIFV [22].

A teoria da circulação de estirpes virulentas e avirulentas foi proposta por Brown *et al* (2009), num estudo que analisou as relações filogenéticas entre os FeCoVs num pequeno número de gatos com PIF e num grupo de gatos assintomáticos [49]. Os autores pretendiam demonstrar a existência de dois tipos distintos de FeCoVs que circulavam de forma independente na população testada: uma estirpe virulenta associada ao desenvolvimento da PIF e uma estirpe avirulenta associada à infeção por FECV. Os autores identificaram cinco aminoácidos na proteína estrutural M que discriminavam estes dois tipos. No entanto, nesse estudo, as amostras eram oriundas de uma população de gatos de abrigo e, como tal é muito provável que a introdução de FeCoVs não relacionados geneticamente tenha acontecido, devido à origem geográfica diferente [49].

Segundo a teoria das quasispécies, os coronavírus apresentam heterogeneidade genética significativa como resultado da acumulação de mutações durante a replicação viral. Por isso, um gato infetado com FeCoV pode apresentar sequências virais heterogéneas (um virião é geneticamente diferente dos restantes) mas estreitamente relacionadas, as quasispécies. Nestes casos a população viral é composta por uma sequência predominante, a sequência principal, e uma série de sequências diferentes dela em várias extensões. Estas últimas podem alterar o tropismo e a patogenicidade celular e podem ter um impacto significativo no desenvolvimento da doença [50].

3.5.3. Entrada do vírus nos monócitos/macrófagos e disseminação sistêmica

O aumento da patogenicidade associada a infecção por FeCoV envolve a infecção dos monócitos, permitindo a propagação sistêmica do vírus. A infecção associada a monócitos, permite ativação e proliferação de mais monócitos, proporcionando ainda mais células-alvo disponíveis para invasão viral ^[25]. Considera-se provável que os linfonodos mesentéricos sejam o ponto de partida para a disseminação sistêmica do FeCoV ^[51].

O FeCoV entra nos monócitos através da ligação à superfície da célula hospedeira. A ligação é mediada por interações entre a proteína estrutural S e o seu recetor específico na célula-alvo. Os vírus do serótipo II utilizam como recetor celular a glicoproteína aminopeptidase-N felina (fAPN), enquanto o recetor celular dos vírus do serótipo I continua por determinar. Sabe-se ainda que, ambos os serótipos usam como co-receptor o fDC-SIGN, um homólogo felino de uma molécula de adesão intercelular específica humana denominada *dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin* (DC-SIGN), uma lectina do tipo C ^[24] ^[25].

A introdução do virião na célula-alvo ocorre através de endocitose (**Figura 13**). Após a entrada, os endossomas libertam o genoma viral no citoplasma, onde fica disponível para replicação, transcrição e tradução. A replicação do genoma ocorre em complexos de replicação-transcrição, formados pelas proteínas não estruturais virais. A enzima RNA polimerase dependente de RNA usa o genoma viral inicial (de sentido positivo) para formar uma molécula intermediária de sentido negativo. Esta molécula é utilizada como molde para a síntese de RNA genómico (replicação) e para a transcrição e tradução dos genes das proteínas estruturais e acessórias [21]. Após a tradução, as proteínas estruturais M, S e E são inseridas no retículo endoplasmático (RE) da célula hospedeira, de onde transitam para o compartimento intermediário do Retículo endoplasmático complexo de Golgi (CIREG). Simultaneamente, a nucleocápside viral, formada a partir da encapsulação do RNA viral pela proteína estrutural N, ao colidir com o CIREG, forma o virião. De seguida, os viriões são transportados em vesículas para perto da membrana plasmática da célula e são libertados por exocitose [21].

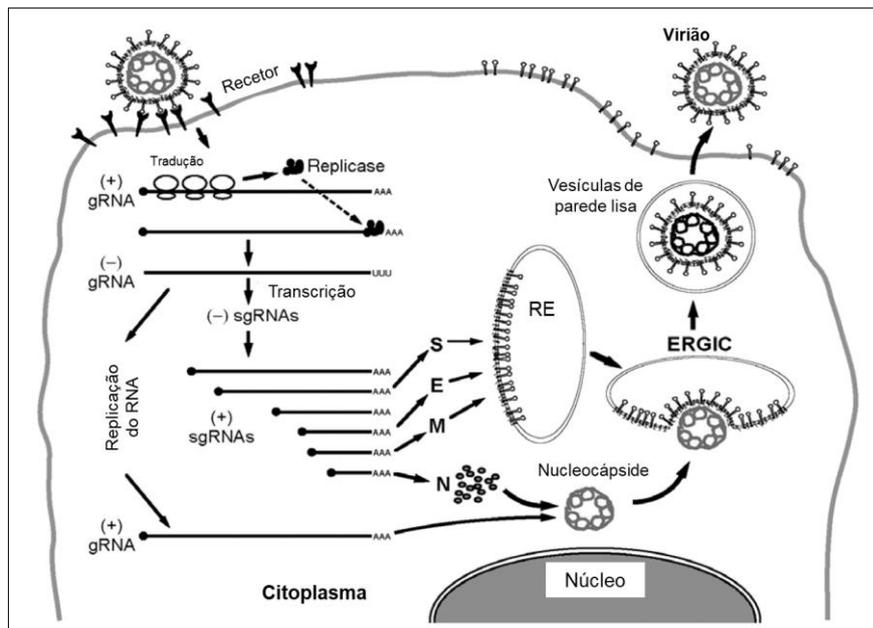


Figura 13 - Representação esquemática do ciclo de vida do FeCoV. Adaptado de Masters (2006) [52].

3.5.4. Resposta Imunitária do hospedeiro

O sistema imunitário é conhecido por desempenhar um papel crucial, mas complexo, na patogénese da PIF. Apesar de não estar completamente compreendido, parece que a imunidade humoral pode efetivamente participar no progresso da doença. Já a imunidade protetora da doença parece ser, em grande parte, mediada por células. Além disso, o tipo e a robustez da resposta imunitária parecem determinar a forma clínica (efusiva e não efusiva) que a infeção apresentará. Está descrito que uma forte resposta imunitária celular previne a infeção por PIFV. Por outro lado, uma resposta imunitária celular fraca ou inexistente associada a uma forte resposta imunitária humoral, resulta na forma efusiva da doença. Já uma resposta imunitária celular e humoral intermédias geralmente conduzem à forma clínica não efusiva ^[44].

Nas infeções pelo FECV, o facto de raramente serem patogénicas sugere que existe um equilíbrio entre a invasão viral e as defesas do organismo hospedeiro. Recentemente *Pearson et al* (2019) mostraram que os gatos que excretavam ativamente FeCoV nas fezes apresentavam níveis elevados de Imunoglobulinas A (IgA) anti-FeCoV na mucosa intestinal, sugerindo que as IgA desempenham um papel importante no combate da infeção inicial ^[53].

No caso das infeções pelo PIFV, a resposta imunitária humoral parece contribuir para a patogénese da doença tanto *in vitro* como *in vivo*, através de dois mecanismos diferentes: potenciação da infeção dependente de anticorpos (ADE) e desenvolvimento de uma reação de hipersensibilidade do tipo III ^{[23] [38]}.

O mecanismo de ADE ainda não está bem esclarecido em gatos afetados pela PIF. Contudo sabe-se que este fenómeno, no caso dos FeCoVs envolve a produção de anticorpos específicos contra a proteína viral S com a formação de complexos antigénio-anticorpo, os quais são incorporados pelos macrófagos e monócitos através da ligação da Fração do Complemento (Fc) do anticorpo a um recetor Fc na superfície destas células. Verificou-se que, quando ocorria ADE, os gatos desenvolviam PIF em menos de 12 dias, mas quando não ocorria ADE, os gatos desenvolviam da doença em 28 ou mais dias. No entanto, este mecanismo apenas foi demonstrado experimentalmente com estirpes laboratoriais, e não com estirpes de campo ^{[34] [38]}.

Quanto à ocorrência de uma reação de hipersensibilidade do tipo III, esta pode estar associada ao desenvolvimento dos sinais clínicos associados a PIF, mas atualmente não está inequivocamente confirmada. Foi sugerido que as imunoglobulinas G ligam-se ao antigénio viral e formam complexos imunitários que se depositam na parede dos vasos sanguíneos, produzindo uma vasculite, pela ativação do complemento ^[23].

Relativamente à imunidade celular, recentemente *Mustaffa-Kamal et al* (2019) investigaram experimentalmente a resposta imunitária dos linfócitos T durante a exposição primária e secundária a uma estirpe de FeCoV associada ao desenvolvimento da PIF ^[54]. Verificaram que, durante a fase inicial da infeção primária por FeCoV, a resposta antiviral dos linfócitos T não permite prever o desenvolvimento da doença, uma vez que mostrou ser semelhante em gatos que desenvolvem PIF e gatos que permaneceram clinicamente saudáveis ^[54]. No entanto, numa fase mais tardia da infeção aguda primária e após uma segunda exposição ao FeCoV, a resposta antiviral dos linfócitos T mostrou controlar a infeção e desenvolvimento da doença ^[54]. No entanto, em gatos que desenvolvem PIF, a resposta imunitária celular, dada pelos linfócitos T, é ineficaz no combate da doença, porque estas células encontram-se marcadamente reduzidas, sobretudo os linfócitos citotóxicos (T-CD8+), tanto no sangue periférico como nos órgãos linfoides. A redução marcada destas células parece estar relacionada com a sua apoptose, induzida pelo fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) produzido pelos macrófagos/monócitos infetados ^[55].

Outra citocina considerada importante moduladora da imunidade inata e adaptativa é o interferão gama (IFN- γ), que parece estar envolvida no combate da infeção inicial por FeCoV. Esta citocina é produzida pelos linfócitos T, linfócitos B, células *Natural Killer* e células apresentadoras de antígenos (p. ex., macrófagos e células dendríticas), sendo importante na ativação inicial dos macrófagos ^[34]. Num estudo realizado por *Giordano & Paltrinieri* (2009), que envolveu gatos naturalmente infetados com FeCoV, clinicamente saudáveis e gatos com a forma efusiva da PIF, demonstrou a presença de elevadas concentrações séricas de IFN- γ em gatos clinicamente saudáveis e elevadas concentrações de IFN- γ nas efusões de gatos com PIF. Isto sugere que, embora gatos resistentes à infeção por FeCoV tenham uma forte resposta imunitária celular, como indicado pela elevada expressão de IFN- γ no soro, a resposta imunitária celular também pode estar envolvida no desenvolvimento de PIF. Indicando que a ativação local de macrófagos pelo IFN- γ pode estar a ocorrer, o que leva ao aumento da replicação viral, como evidenciado pela elevada concentração de IFN- γ nas efusões ^[56].

3.6. Diagnóstico

3.6.1. Anamnese

Na abordagem à anamnese perante um paciente suspeito de PIF é importante ter em consideração três aspetos. O primeiro aspeto é obter informação acerca da idade, género e raça do paciente. Tal como referido anteriormente, grande parte dos casos de PIF ocorre em machos e jovens, normalmente até aos três anos de idade e de raças puras. O segundo aspeto a considerar é se o paciente foi submetido a algum evento stressante, por exemplo uma cirurgia, doença recente, traumatismo ou introdução de um novo animal, algumas semanas antes do aparecimento dos sinais clínicos. O terceiro e último aspeto a considerar é se o paciente esteve em contacto com gatos infetados com FeCoV nos últimos 18 meses, o que ocorre mais frequentemente em gatis de reprodução ou centros de abrigo de animais ^[40].

3.6.2. Apresentação clínica

Em condições experimentais, o período de incubação viral varia entre dois a catorze dias na forma efusiva e de várias semanas a meses na forma não efusiva. Apesar do período de incubação em infeções naturais não ser conhecido, pensa-se que a infeção possa permanecer em estado subclínico durante semanas, meses e até mesmo anos antes de serem notados sinais clínicos ^[57].

Tipicamente, a PIF manifesta-se de duas formas distintas que refletem os extremos clínicos de um processo que é contínuo, existindo por exemplo gatos com sinais característicos da forma não efusiva que evoluem para a forma efusiva com a progressão da doença. Por isso, a reavaliação clínica periódica do paciente é sempre importante para detetar novas alterações ^[51]. Os sinais e sintomas clínicos gerais associados à infeção por PIF são inespecíficos e podem incluir letargia, anorexia, perda de peso, atraso no crescimento em animais jovens, vómitos, diarreia, pirexia flutuante (geralmente não responde a antibióticos ou anti-inflamatórios não esteroides) e linfadenomegalia ^[58]. Outros sinais que podem estar presentes dependem da forma clínica da doença e serão mencionados de seguida.

3.6.2.1. Forma efusiva

A forma efusiva da doença possui uma natureza bastante aguda, progredindo em poucos dias ou semanas e limitando severamente a sobrevivência ^[51]. Os sinais clínicos dependem do local onde ocorrem as efusões. *Riemer et al* (2016) reportaram que nos gatos afetados pela forma efusiva da doença, 78,3% apresentavam ascite, 13,1% apresentam efusão torácica, 8,0% apresentavam ascite e efusão torácica em simultâneo e apenas 0,6% apresentavam ascite e efusão pericárdica em simultâneo ^[32].

Nos animais com efusões peritoneais, o abdómen apresenta-se muito distendido e indolor à palpação (**Figura 14**). A percussão da parede abdominal facilmente induz uma onda fluida. Já os gatos com efusão pleural demonstram tipicamente dispneia e taquipneia ^[51]. Ocasionalmente pode ocorrer efusão escrotal em machos inteiros, devido à serosite da túnica vaginal dos testículos, apresentando-se estes distendidos e edemaciados ^[57].



Figura 14 - Ascite presente num gato da raça *British Shorthair* com a forma efusiva de PIF. De notar o paciente com abdómen distendido e pendular. Adaptado de *Barker & Tasker* (2019) ^[59].

3.6.2.2. Forma não efusiva

A PIF não efusiva possui natureza crônica, progredindo ao longo de semanas a meses ^[51]. Os sinais clínicos dependem dos órgãos afetados pelas lesões granulomatosas. Apesar de, na maioria das vezes, as lesões se encontrarem ao nível do sistema nervoso central, olhos e órgãos abdominais, qualquer tecido pode ser afetado ^[51].

De entre os sinais oculares, a uveíte (anterior e/ou posterior) é a manifestação ocular predominante. As alterações oculares incluem a descoloração da íris, edema da córnea, discoria, anisocoria, perda repentina de visão, coreoretinite, hifema, hipópion, precipitados queráticos, descolamento da retina e *flare* aquoso/vítreo. Estas alterações podem ser unilaterais ou bilaterais, assim como subtis ou severas (**Figura 15**) ^[51].

Os sinais neurológicos refletem alterações focais, multifocais ou difusas no cérebro, medula espinhal e meninges, sendo que os mais comuns incluem ataxia, convulsões, nistagmos, hiperestesia e défices associados aos pares de nervos cranianos ^[51] ^[60].

A forma clínica não efusiva pode manifestar-se sob a forma de vários nódulos abdominais, detetados durante o exame físico, estando estes associados a lesões granulomatosas e presença de dor à palpação ^[51]. Ocasionalmente pode manifestar-se por uma lesão intestinal isolada (denominado de “PIF focal”), apresentando-se esta como uma massa abdominal palpável ao exame físico. Os sinais clínicos destas apresentações podem incluir vômitos, diarreia ou obstipação. O envolvimento da parede do ceco e do cólon com a linfadenopatia ceco-cólica está associado a fezes pastosas, com sangue e muco ^[51].



Figura 15 - A imagem do lado esquerdo mostra precipitados queráticos na córnea interna e a forma da pupila em D invertido devido à infiltração de células inflamatórias na íris. Adaptado de Pedersen et al (2009) ^[56]. A imagem do lado direito mostra uveíte anterior no olho direito, com neovascularização (rubeosis iridis) e hifema. Adaptado de Dreschler et al (2011) ^[34].

3.6.3. Parâmetros hematológicos

No que diz respeito ao eritrograma, a anemia ligeira a moderada normocrítica e normocrômica é a alteração mais comum, ocorrendo em 37 a 54% dos casos^{[51][58]}. Uma possível explicação para esta anemia pode ser a formação de piogranulomas no córtex renal, que afetam os níveis de eritropoietina, causando supressão da medula óssea. Também está descrita a presença de microcitose, com ou sem anemia associada, a qual pode potencialmente estar associada à redução da absorção de ferro intestinal devido à ação da hepcidina. Esta proteína inibe a absorção de ferro no intestino estimulada pelas interleucinas um (IL-1) e seis (IL-6), as quais estão elevadas em gatos com PIF^{[32][51][62]}. Ainda que pouco frequente, estão descritos casos de anemia hemolítica imunomediada. Uma possível explicação para tal pode ser a libertação de IL-6 pelos monócitos infetados e ativados, que causa a ativação de células plasmáticas auto-reactivas^[61].

As alterações mais comuns no leucograma são a leucocitose por neutrofilia (39 a 57% dos casos) e linfopenia (49 a 77% dos casos)^[32]. Por um lado, a neutrofilia pode ser explicada pelo facto dos macrófagos infetados libertarem citocinas, nomeadamente o TNF- α , fator estimulador de colónias de granulócitos-macrófagos e fator estimulador de colónias de granulócitos. Quando estas citocinas atuam sobre os neutrófilos, os níveis intracelulares da proteína inibitória da apoptose aumentam, enquanto os níveis da proteína promotora da apoptose diminuem, prolongando a sobrevivência dos neutrófilos^[55]. Por outro lado, a linfopenia, deve-se à indução da apoptose dos linfócitos T, em particular dos linfócitos T-CD8+, pela libertação de TNF- α dos macrófagos infetados^{[32][62]}.

3.6.4. Bioquímica sérica

A bioquímica sérica dos gatos infetados com PIF pode revelar hiperbilirrubinemia. Níveis elevados de bilirrubina sem anemia hemolítica imunomediada nem elevações moderadas das enzimas hepáticas aumentam a suspeita da doença. No estudo de *Riemer et al* (2016), reportaram a presença de bilirrubinemia em 68% dos gatos com a forma efusiva da PIF e em 43% dos gatos com a forma não efusiva. Estes valores devem-se às microhemorragias nos tecidos afetados pela inflamação e vasculite (possivelmente mais severa na forma efusiva) que causam a destruição extravascular dos glóbulos vermelhos. A inflamação compromete também o metabolismo e a excreção de ácidos biliares devido a diminuição da expressão dos transportadores hepatocelulares. Assim a bilirrubina tende a acumular-se no soro ou plasma, apresentando-se estes ictéricos^{[32][57]}.

A anorexia aliada à inflamação intestinal em gatos com PIF, limita o consumo e absorção dos nutrientes presentes nos alimentos, conduzindo à perda de peso e redução da massa muscular, o que contribui para a redução dos níveis de ureia e creatinina séricos^[63].

3.6.5. Proteinograma e proteínas de fase aguda

O aumento das globulinas séricas (hiperglobulinemia), mais precisamente das γ -globulinas (hipergamaglobulinemia), ocorre em 89% dos animais infetados, como resultado de uma resposta imunitária não específica [32] [51]. A hiperglobulinemia pode ser acompanhada da diminuição da concentração sérica da albumina (hipoalbuminemia) ou pela concentração de albumina no limite inferior do valor de referência, descritas em 64,5% dos casos. Assim, a hiperglobulinemia nem sempre é acompanhada de hiperproteinemia [32] [51].

A combinação de hiperglobulinemia e hipoalbuminemia produz um rácio albumina: globulinas (A/G) baixo. Os valores de *cut-off* séricos do rácio A/G para diagnóstico de PIF variam entre os estudos, mas considera-se que um valor de rácio A/G inferior a 0,4 torna o diagnóstico muito provável, enquanto um rácio A/G superior a 0,8 torna o diagnóstico improvável [58].

Outra análise que pode ser usada para apoiar o diagnóstico de PIF, principalmente quando se suspeita da forma não efusiva da doença, é a eletroforese das proteínas séricas. Cerca de 95,1% dos gatos afetados pela PIF possuem distribuição anormal destas proteínas. O padrão eletroforético é caracterizado por um aumento das globulinas α_2 e γ . A fração de α_2 aumenta mais rapidamente como resposta à síntese de proteínas plasmáticas de fase aguda, enquanto a fração γ aumenta cerca de duas semanas depois, quando a resposta imunitária humoral é ativada e a manifestação clínica da doença se inicia [64]. Estão descritas gamopatias policlonais e monoclonais em gatos com PIF, contudo as primeiras são muito mais comuns [50]. Nos últimos anos, tem-se verificado uma diminuição da frequência e extensão da hipoalbuminemia, da hiperglobulinemia, assim como do baixo rácio A/G. Este facto sugere que a doença é diagnosticada cada vez mais cedo e os casos não progredirem o suficiente para mostrarem alterações mais acentuadas [51] [64].

As proteínas de fase aguda (PFA) são produzidas no fígado em resposta às citocinas libertadas pelos macrófagos e monócitos infetados ativados, especialmente interleucinas IL-1 e IL-6 e fator de necrose tumoral- α [51]. Para o diagnóstico de PIF, a PFA mais representativa em gatos é a alfa-1 glicoproteína ácida (AGP). Está descrito que, gatos com sinais clínicos e fatores de risco característicos de PIF, valores de AGP superiores a 1,5 g/L, são consistentes com a doença. Em gatos sem sinais clínicos ou fatores de risco característicos de PIF, apenas valores AGP iguais ou superiores a 3 g/L podem auxiliar no diagnóstico [51].

3.6.6. Análise da efusão

Quando os gatos suspeitos de PIF apresentam efusões cavitárias a recolha desse líquido é um procedimento terapêutico e sua avaliação completa é um procedimento de diagnóstico extremamente útil (**Figura 16**).

As efusões típicas de PIF podem apresentar cor palha até amarela escura. Nesta última, se estiverem presentes concentrações elevadas de bilirrubina. Apresentam uma consistência viscosa e podem variar de límpidas a turvas. Podem também ser visíveis coágulos de fibrina ^[51].

As efusões de PIF são frequentemente descritas como transudados modificados com base nas contagem de células totais e concentração de proteínas totais ^[51]. No que diz respeito à contagem de células totais nucleadas esta é usualmente baixa e encontra-se compreendida entre 1000 e 6000 células/ μ l, mas pode chegar a 30000 células/ μ l. Em relação à concentração proteica esta é tipicamente moderada a marcada, estando compreendida entre 3,5 a 9,8 g/dL. Mais de metade do conteúdo proteico da efusão são globulinas, sobretudo imunoglobulinas. Os valores do rácio A/G são baixos (geralmente inferiores a 0,9) ^{[51][58][65]}.

Outra análise frequentemente realizada nas efusões e que pode auxiliar no diagnóstico é o teste de Rivalta. É um exame barato, rápido e fácil de realizar na prática clínica. Mede a quantidade de proteínas e mediadores inflamatórios nas efusões, originalmente utilizado para diferenciar transudados e exsudados. Este exame é considerado positivo se ocorrer a formação de um precipitado bem delimitado e que flutua numa solução de oito ml de água destilada e uma gota de ácido acético a 98%, após a adição da gota de efusão. Se a gota da amostra de efusão se dissolver e a solução permanecer límpida, o teste é considerado negativo. Quando surgirem remoinhos que não formam um precipitado distinto nem se dissiparam completamente, o teste é considerado questionável. O teste de Rivalta apresenta um valor preditivo negativo de 93%. O que significa que um resultado negativo é útil para excluir a PIF. No entanto, um resultado positivo tem um valor preditivo positivo de 58%. O que significa que um teste positivo necessita de confirmação desta infeção com outros exames ^[66].

Se o teste de Rivalta for positivo, a citologia da efusão pode ser útil para determinar a causa. Nas efusões causadas pela PIF, a citologia revela tipicamente uma inflamação de natureza piogranulomatosa, com macrófagos ativados, neutrófilos não degenerados e muito poucos linfócitos maduros. É típico observar algum material granular eosinofílico em pano de fundo, correspondendo a proteínas (imunoglobulinas) ^[51].

Outro parâmetro que permite avaliar o conteúdo proteico das efusões é a contagem total de células nucleadas (CTCN) fornecida pelo analisador hematológico *Sysmex XT – 2000iV*[®] (*Sysmex Corporation, Kobe, Japão*), que quantifica e diferencia as células presentes nas efusões através de dois canais diferentes (WBC/DIFF e WBC/BASO). O rácio entre ambos os canais, corresponde ao *delta* do total das células nucleadas (Δ TCN), cujo valor em animais saudáveis é muito próximo de um. Nas efusões causadas pela PIF, a presença de proteínas de alto peso molecular e mediadores inflamatórios, ao contactarem com o reagente ácido presente num dos canais formam aglomerados que impedem a sua quantificação, resultando num rácio muito mais alto. Foi demonstrado que um valor de *cut-off* superior ou igual a 2,5 apresenta 100% de especificidade para o diagnóstico ^[67].

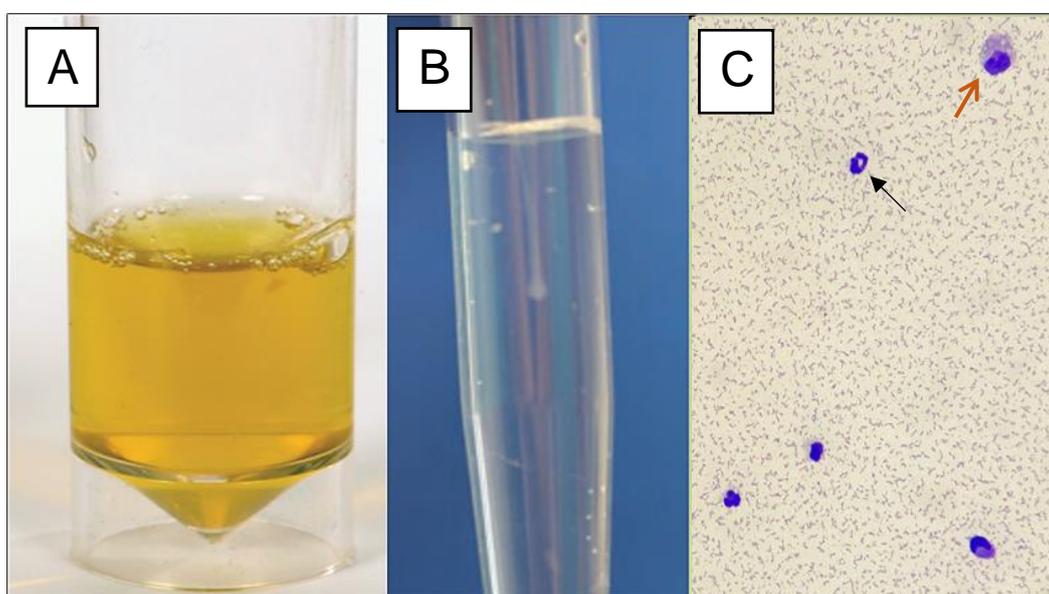


Figura 16 – (A) amostra de efusão abdominal de cor palha, límpida e viscosa, típica de um gato com PIF, adaptado de *Barker & Tasker, (2020)* ^[51]. (B) teste de Rivalta positivo, após ser colocada uma gota de efusão abdominal sobre a superfície da solução de 8 mL de água destilada e ácido acético a 98%, a gota manteve a sua forma à superfície, adaptado de *Fischer et al (2012)* ^[66]. (C) citologia de transudado modificado típico da PIF com escassa celularidade, neutrófilo não degenerado (seta preta) e macrófago (seta vermelha) sobre um fundo granular eosinofílico proteico (Adaptado de caso de citologia do L. V. INNO).

3.6.7. Análise do líquido cérebroespinal

O líquido cérebroespinal (LCE) de gatos com sinais neurológicos de PIF apresenta conteúdo proteico abundante, compreendido entre 0,3 g/L e 0,46 g/L. A contagem de leucócitos no LCE é geralmente inferior ou igual a 8 células/ μ L, podendo a pleocitose em caso de PIF apresentar contagens superiores a 100 células/ μ L. A citologia pode revelar inflamação neutrofílica, mononuclear ou mista. Contudo as alterações detetadas no LCE em gatos com PIF podem estar presentes noutras doenças e gatos com PIF podem ter este fluido sem quaisquer irregularidades [68].

3.6.8. Imagiologia

A nível imagiológico, a ecografia e a radiografia podem ser úteis para identificar alterações em vários órgãos, identificar efusões cavitárias, assim como ajudar na recolha de amostras de efusões e de tecidos para análise [51].

Nenhum achado imagiológico é específico para a doença, sendo que gatos com PIF podem apresentar exames imagiológicos sem quaisquer alterações. Porém, caso seja detetada alguma alteração, esta deve ser interpretada juntamente com outras informações clínicas e laboratoriais, de forma a ajudar a aumentar o índice de suspeita da doença [51].

Em relação ao exame radiológico do tórax este pode revelar derrame pleural, aumento da silhueta cardíaca devido a efusão pericárdica e/ou pneumonia piogranulomatosa. Já o exame radiológico do abdómen pode revelar perda de detalhe peritoneal ou retroperitoneal devido a efusão peritoneal, hepatomegália, renomegália, hiperplasia dos linfonodos mesentéricos e lesões granulomatosas no trato gastrointestinal [69].

No que respeita ao exame ecográfico, um estudo realizado por *Lewis & O'Brien*, em 16 gatos com PIF, demonstrou a presença dos seguintes achados: fígado difusamente hipoecóico (n=3); fígado focalmente hiperecóico (n=1); fígado focalmente hipoecóico (n=1); hepatomegália (n=1); bordo subcapsular renal hipoecóico (n=5); renomegália bilateral (n=3); renomegália unilateral (n=3); fluido peritoneal (n=7); fluido retroperitoneal (n=1); espessamento difuso do intestino delgado (n=2); espessamento com perda de detalhe do cólon (n=1); linfadenopatia abdominal (linfonodos hepáticos, mesentéricos e sublombares) (n=9); massas abdominais (linfadenopatia) (n=3); hipoecogenecidade esplénica (n=2); orquite bilateral com perda de arquitetura testicular (n=1) [70]. Neste estudo 80% dos gatos tinham um fígado de tamanho normal e 69% destes tinham uma ecogenecidade normal. Em 88% dos casos o baço tinha uma aparência ultrassonográfica normal. Em mais de metade dos casos (56%) os rins apresentavam um tamanho normal e em 44% dos casos, estes não tinham alterações de ecogenecidade [70].

Quando os gatos apresentam sinais neurológicos, a ressonância magnética craniana, se disponível, pode revelar hidrocefalia obstrutiva, siringomielia, herniação do *foramen magnum* e aumento do contraste das meninges, do terceiro ventrículo, do aqueduto mesencefálico e do tronco cerebral. No entanto, gatos com PIF podem não apresentar alterações na ressonância magnética [71].

3.6.9. Testes serológicos

Existem vários métodos que permitem determinar a presença de anticorpos anti-FeCoV em amostras de soro, efusões cavitárias e LCE, nomeadamente: testes de imunofluorescência indireta (utilizando FeCoV ou TGEV como antigénio); testes enzimáticos de imunoadsorção (ELISA) e testes de neutralização viral [58].

A importância da deteção de anticorpos para confirmar PIF é muito limitada, porque os testes não conseguem diferenciar anticorpos anti-FeCoV e anti-PIFV. Um teste de serológico positivo indica apenas que o gato contactou com o antigénio viral e desenvolveu anticorpos, o que geralmente ocorre em duas a três semanas após a infeção natural [58]. No entanto, os testes serológicos podem ser usados numa variedade de situações: para monitorizar o tratamento de gatos com PIF; para testar animais antes do acasalamento; para testar gatinhos de progenitoras infetadas; para testar um gato antes de uma transfusão sanguínea [72].

Caso a deteção de anticorpos seja realizada a titulação deve ser tida em conta. As titulações baixas e médias não têm valor diagnóstico para a PIF e, embora uma titulação crescente (superior ou igual a 1:1600) possa ser detetada durante a progressão da doença, a mesma é válida para FeCoV [34] [41].

Numa fase mais avançada da doença, a serologia de gatos com PIF pode ser negativa, devido à elevada carga viral, a qual promove a ligação de um grande número de anticorpos aos antigénios, fazendo a sua quantidade sérica descer abaixo do limite de deteção dos testes. O mesmo pode acontecer quando a serologia é realizada em efusões, em gatos afetados pela forma efusiva da PIF, porque os anticorpos são transferidos do sangue para a efusão [67]. Além disso, podem ocorrer resultados falsos positivos na serologia devido a anticorpos antinucleares, causados por infeções concomitantes por FIV ou certos fármacos, como o tiamazol e o metimazol [34].

Cerca de 77% dos gatos que apresentam anticorpos anti-FeCoV excreta o vírus nas fezes. Gatos com títulos de anticorpos mais elevados tem maior predisposição para excretar FeCoV nas fezes e em maior quantidade, comparativamente a gatos com títulos de anticorpos mais baixos ou sem anticorpos [27].

Os anticorpos anti-PIF podem ser detetados em LCE de gatos com sinais neurológicos, mas o valor diagnóstico da sua presença é limitado. *Boettcher et al.* (2007) encontraram uma correlação significativa entre a concentração de anticorpos séricos e anticorpos no LCE, sugerindo que os anticorpos detetados no LCE eram derivados do sangue, pelo que a sua deteção não foi adicionalmente útil para o diagnóstico de PIF [73].

3.6.10. Diagnóstico molecular através de RT-PCR

A aplicação da técnica de transcriptase reversa seguida de reação em cadeia de polimerase (RT-PCR) é frequentemente utilizada para amplificar o material genético viral e diagnosticar PIF [27]. No entanto, é importante ter em conta que, apesar dos gatos com PIF apresentarem cargas virais muito mais elevadas do que os gatos infetados com FeCoV, este método pode amplificar RNA de FeCoV em gatos sem PIF. Por isso, uma forma de facilitar o diagnóstico de PIF é a utilização de um método que permita a deteção e a quantificação da carga viral em simultâneo, como o RT-PCR em tempo real [34].

O método de RT-PCR em tempo real pode ser aplicado para detetar PIF em amostras de tecidos, sangue, efusões, LCE e humor aquoso. Também pode ser realizado em amostras fecais, principalmente no maneiio da infeção por FeCoV em ambientes com múltiplos gatos [58].

Em relação à deteção viral em amostras de tecidos, o RT-PCR em tempo real possui bons resultados quando aplicado em amostras com lesões por apresentarem maior carga viral. Quando realizado em amostras de tecidos abdominais obtidas por aspirados de agulha fina (AAF) de forma ecoguiada, o RT-PCR mostra ser uma boa alternativa em relação às amostras obtidas por laparotomia ou biopsia percutânea, por ser um procedimento de colheita mais prático, menos invasivo e possuir igualmente bons resultados. Um estudo publicado por *Dunbar et al* (2019), reportou uma sensibilidade de 90,0% e especificidade de 96,1% do RT-PCR para o diagnóstico de PIF, em amostras recolhidas *ante-mortem* por AAF dos linfonodos mesentéricos [74].

A deteção de antigénio por RT-PCR em amostras de efusões é considerada uma opção válida para o diagnóstico definitivo *ante-mortem* [58]. Atualmente existem testes de RT-PCR em tempo real que além de serem capazes de identificar RNA de FeCoV, conseguem caracterizar seções genómicas presentes nas amostras de efusões e identificar mutações específicas no gene da proteína S, através de sondas de hidrólise específicas, piro sequenciamento ou sequenciação de *Sanger*. A caracterização de sequências é extremamente útil, pois existindo mutações específicas de PIFV, a sua deteção confirma o diagnóstico. O PCR utilizado para fins de diagnóstico deteta as mutações M1058L e S1060A [68] [75].

3.6.11. Histopatologia

Um dos procedimentos de diagnóstico *ante-mortem* é a recolha de amostras dos órgãos afetados por biópsia percutânea ou laparotomia, para avaliação histopatológica. Contudo a natureza invasiva destes procedimentos torna inviável a sua realização em gatos doentes. Por isso, geralmente tais amostras são recolhidas após a morte do animal, para pesquisa de lesões características da doença, que quando presentes são consideradas diagnósticas [58].

A nível macroscópico, a forma efusiva de PIF é caracterizada pela presença de efusões cavitárias (peritoneais, torácicas e/ou pericárdicas) e de piogranulomas. Estes últimos afetam frequentemente as superfícies serosas do fígado, baço, intestino, rins e pulmões, com envolvimento variável do parênquima dos órgãos. A nível microscópico os piogranulomas estão concentrados nas veias de pequeno e médio calibre e são constituídos por uma zona central com agregados de macrófagos carregados de vírus, rodeados por um exsudado inflamatório rico em neutrófilos, macrófagos e escassos linfócitos e plasmócitos [23].

A forma não efusiva de PIF é caracterizada a nível macroscópico pela presença de granulomas que se estendem desde as superfícies serosas até ao parênquima dos órgãos afetados. Entre os principais órgãos afetados estão os rins, olhos, cérebro, linfonodos mesentéricos, omento, intestino e fígado. A nível microscópico os granulomas contêm agregados de macrófagos (alguns dos quais sem antigénios virais) ao redor de vasos sanguíneos, os quais são por sua vez rodeados por infiltrados densos de linfócitos B e plasmócitos [23].

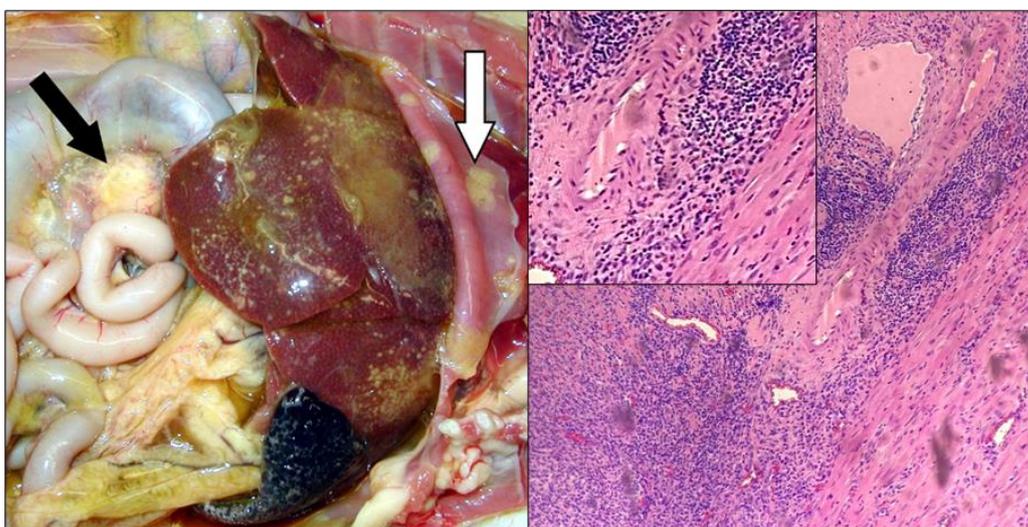


Figura 17 - A imagem do lado esquerdo mostra a necrópsia de um gato, onde se visualizam placas lisas branco-amareladas que cobrem as superfícies parietal e visceral do peritoneu (seta branca) e os linfonodos do intestino aumentados (seta preta), adaptado de Dreschsler et al (2011) [34]. A imagem do lado direito mostra um corte histológico do intestino com enterite crónica grave e extensa, constituída por áreas linfocíticas e piogranulomatosas, com vasculite (adaptado de caso de histopatologia do L. V. INNO).

3.6.12. Imunohistoquímica e imunocitoquímica

Apesar da presença de lesões histopatológicas típicas permitirem realizar o diagnóstico definitivo de PIF, por vezes os tecidos dos gatos afetados não apresentam alterações consistentes com a doença, mesmo sendo realizadas biópsias representativas ^[58].

A imunocoloração tem como objetivo a demonstração do antígeno viral nos macrófagos através de imunohistoquímica, usando tecidos fixados em formol, ou imunocitoquímica, usando amostras de efusões ou aspirados de tecidos. Estas técnicas detetam a ligação antígeno-anticorpo associada aos macrófagos ou monócitos, através de reações enzimáticas que produzem uma mudança de cor ^[58] ^[68]. Tanto o FeCoV como o PIFV podem estar presentes nos macrófagos dos gatos infetados, mas apenas o PIF está presente em quantidade suficiente para poder ser detetado por tais reações enzimáticas ^[68].

Um resultado positivo na imunohistoquímica confirma um diagnóstico de PIF, mas um resultado negativo não exclui a infeção, uma vez que os antígenos virais podem estar distribuídos irregularmente pelas lesões e podem não ser detetados em todas as secções histopatológicas. Isto contradiz em certa medida a ideia de que a imunohistoquímica é essencial para confirmar ou excluir o diagnóstico. Contudo, esta condição pode ser ultrapassada através da recolha de várias amostras de tecidos ou amostras maiores ^[58] ^[68].

A imunocitoquímica realizada em amostras de efusões demonstra sensibilidade entre 57 a 100%. Esta grande variabilidade deve-se ao pouco conteúdo celular das efusões e/ou o antígeno estar mascarado pelos anticorpos, fazendo com que a coloração do antígeno viral nos macrófagos seja um desafio, e a probabilidade de ocorrerem falsos negativos deva ser tida em consideração, quando se opta pela realização deste exame ^[58] ^[68].

3.7. Tratamento

Atualmente não se encontra disponível um tratamento que cure definitivamente a PIF, por isso esta continua a ser uma doença progressiva e tendencialmente fatal, apesar de existirem fármacos antivirais (referidos mais adiante) que têm mostrado resultados promissores na remissão temporária da doença e no aumento das taxas de sobrevivência em vários pacientes. No entanto, o acesso aos antivirais é atualmente problemático, uma vez que ainda não obtiveram registo para utilização veterinária.

De acordo com o estudo de *Izes et al* (2020), para o tratamento da PIF são usadas três grandes abordagens: 1) fármacos imunossupressores para atenuar a resposta imunitária; 2) uso de fármacos imunomoduladores para atenuar a resposta inflamatória de forma não específica; 3) utilização de agentes antivirais para inibir a replicação viral ^[76].

É frequente a utilização de mais de uma abordagem terapêutica em conjunto para o tratamento da doença, associando fármacos imunomoduladores, imunossupressores e ainda, a fármacos antivirais, sendo relevante manter um controlo da eficácia do tratamento estipulado para preservar a segurança do paciente ^[76].

3.7.1. Tratamento anti-inflamatório e imunossupressor

Como o PIF é uma doença imunomediada, a terapia às vezes inclui suprimir a resposta imunitária e consiste na administração de fármacos que produzem efeitos imunossupressores.

A prednisolona é o imunossupressor mais usado no tratamento da PIF, por ser bastante acessível, relativamente seguro, por estimular o apetite e melhorar a condição clínica dos pacientes. É geralmente administrada por via oral numa dose inicial administrada a cada 24 horas, com redução gradual a cada duas semanas com base na resposta ao tratamento. O tratamento consiste na administração inicial de dois miligramas por quilograma de peso corporal, via oral a cada 24 horas (SID) durante 10 a 14 dias. Caso exista melhoria clínica, a dose passa para um miligrama por quilograma de peso corporal, SID durante mais 10 a 14 dias. Depois passa para 0,5 mg/kg/SID todos os dias ^[61].

A dexametasona pode ser utilizada na forma efusiva da PIF sendo, nestes casos, administrada diretamente na cavidade abdominal ou torácica na dose de um miligrama por quilograma de peso corporal (caso a efusão esteja presente em ambas as cavidades, a dose deve ser dividida por cavidade) a cada cinco dias, até deixar de ser produzida efusão ^[77].

Apesar dos seus benefícios, a prednisolona suprime a resposta imunitária humoral e celular. Por isso, é possível que tratamentos anti-inflamatórios alternativos sejam mais eficazes no tratamento do PIF. *Hugo & Reading (2015)*, relataram 787 dias de sobrevivência num gato tratado oralmente com meloxicam na dose de 0,05 mg/kg/SID e um mês de metronidazol e tramadol. Assim, desde que a função renal e a pressão arterial estejam normais, o meloxicam pode ser uma alternativa eficaz ao uso de corticosteroides ^[78].

3.7.2. Tratamento imunomodulador

O objetivo do tratamento imunomodulador é estimular a resposta imunitária mediada por células ou reduzir a resposta imunitária humoral. No entanto esta abordagem pode não produzir os efeitos benéficos esperados, uma vez que a estimulação imunitária promove o aparecimento e agravamento dos sinais clínicos.

O imunoestimulante poliprenil (IPP) é um composto biológico veterinário que tem demonstrado resultados promissores no tratamento da forma não efusiva da PIF. O composto está comercialmente disponível nos Estados Unidos da América (EUA) e Europa. Quando administrado por via oral, três vezes por semana, regula positivamente a ação dos linfócitos T *helper* 1. *Legendre et al (2017)* avaliaram o tratamento com IPP em 60 gatos suspeitos de ter a forma não efusiva de PIF. Dos 60 gatos tratados, 16 sobreviveram 100 dias, 8 sobreviveram 200 dias e 4 sobreviveram 300 dias. Apesar dos resultados deste estudo serem promissores para o tratamento de gatos com PIF não efusivo, o número de gatos que responderam ao tratamento foi, no geral, baixo, sendo necessários estudos clínicos controlados para avaliar a eficácia e segurança deste tratamento ^[79].

3.7.3. Tratamento antiviral

3.7.3.1. Interferão α e ω

Existem no mercado dois interferões que são usados frequentemente no tratamento das retrovíroses em gatos: o interferão- α recombinante humano e o interferão- ω recombinante felino. Os interferões são espécie-específicos, por isso é melhor usar interferão felino do que interferão humano. Contudo, em alguns países, apenas o interferão humano está disponível para ser utilizado ^[61].

O protocolo de administração do interferão- α recombinante humano, na forma não efusiva, consiste na aplicação oral de 30 Unidades Internacionais (UI)/Kg, uma vez por dia ou durante sete dias em semanas alternadas. Na forma efusiva da doença, o protocolo de administração consiste na aplicação parenteral (intramuscular ou subcutânea) de 104 a 106 UI/Kg diariamente [61]. Quando dado parenteralmente, este protocolo torna-se ineficaz após três a sete semanas devido ao desenvolvimento de anticorpos contra o IFN- α humano. Contudo, se administrado por via oral, como não há produção de anticorpos, pode ser administrado por um período mais longo. No entanto, oralmente é inativado pelo ácido gástrico e destruído por enzimas proteolíticas no duodeno, sendo os efeitos antivirais diretos improváveis por esta via de administração. Oralmente parece ter apenas atividade imunomoduladora na cavidade oral, estimulando o tecido linfóide local e levando à libertação de citocinas, que acabam por atuar sistematicamente [80].

O interferão- ω recombinante felino é uma glicoproteína monomérica relacionada com os interferões alfa e beta. É produzido por leucócitos infetados pelos vírus e tem propriedades antivirais e imunomoduladoras. O interferão ômega estimula a atividade das células *Natural Killer* e aumenta a expressão da classe I do complexo maior de histocompatibilidade. Pode ser administrado por via oral, porque apresenta resistência ao ácido gástrico [38]. É comercializado em recipientes com 10 milhões de unidades e deve ser reconstituído com um mililitro de diluente. A solução pode ser distribuída por 10 seringas de um mililitro, cada uma contendo 0,1 mL de solução, que corresponde a 100000 unidades. Nove das 10 seringas podem ser congeladas, mantendo as propriedades do interferão até seis meses. A décima seringa é diluída com 4,9 mL de solução de cloreto de sódio a 0,9%, perfazendo cinco mililitros de solução com um milhão UI de interferão (50000 UI/ml). A solução é armazenada no frigorífico a uma temperatura de quatro graus celsius até três semanas. O tratamento consiste na administração oral e diária de 100000 unidades de interferão- ω recombinante felino (corresponde a 0,5 ml de solução) *ad eternum* de forma paliativa (até recuperação ou morte) [61].

3.7.3.2. Inibidores das proteases

Após a entrada do virião nas células-alvo, os FeCoVs produzem duas poliproteínas virais que são subsequentemente divididas em 16 proteínas não estruturais funcionais, pela ação de proteases virais específicas, previamente referidas. Sabendo que estas proteínas não estruturais são indispensáveis para a replicação viral, os inibidores das proteases ao ligarem-se a estas proteases virais específicas, bloqueiam a clivagem dos precursores proteicos necessários para a produção das partículas virais [76].

Pedersen et al (2018) investigaram a eficácia da aplicação de um inibidor da 3C-like protease (também denominada protease principal), o GC376 no tratamento de 20 gatos naturalmente infectados com PIF. Foi administrado por via subcutânea numa dose de 15 mg/kg, a cada 12 horas. Neste estudo apenas um terço dos gatos sobreviveu a longo prazo. A ausência de remissão progressiva foi associada a uma elevada incidência de doença neurológica durante ou após o tratamento ser interrompido ou à recorrência de lesões abdominais. Os efeitos secundários do tratamento incluíam focos de fibrose subcutânea, queda de pêlo e erupção anormal da dentição permanente em gatos tratados antes das 18 semanas de idade ^[81].

3.7.3.3. Nucleosídeos análogos

Outra abordagem promissora no tratamento da PIF é a utilização de nucleosídeos análogos que interrompem a síntese de RNA durante a transcrição, através da inibição da RNA polimerase dependente de RNA ^[82].

Pedersen et al (2019) avaliaram o poder do nucleosídeo análogo GS-441524 no combate à PIF, em 31 gatos naturalmente infectados com a doença (não foram incluídos gatos com doença neurológica e/ou ocular graves). O nucleosídeo análogo GS-441524 é um derivado do GS-5734, um pró-fármaco usado na prevenção de alguns vírus RNA em laboratório (p. ex., Vírus da síndrome respiratória do Médio Oriente e vírus Ébola). O tratamento aplicado consistiu numa injeção subcutânea de dois miligramas por quilograma de peso corporal, a cada 24 horas. O período mínimo de tratamento foi de doze semanas. Nos casos em que, ao fim desse período, os valores de proteínas séricas continuaram elevados, o tratamento foi prolongado e a dose aumentada para quatro miligramas por quilograma de peso corporal. A resposta clínica ao tratamento consistiu na resolução da febre, da icterícia e das efusões abdominais. A maioria das recaídas consistiu em febre, anorexia e prostração. Até à publicação deste estudo (fevereiro de 2019) 24 dos pacientes mantiveram-se saudáveis ^[82].

Dickinson et al (2020) descreveram o tratamento com GS-441524, em quatro gatos com sinais neurológicos e oculares de PIF documentando resultados muito promissores. O tratamento aplicado consistiu na administração subcutânea de cinco a 10 mg/kg a cada 24 horas, durante pelo menos 12 semanas. Três dos quatro pacientes apresentaram sobrevivência entre um ano e um ano e meio, após o início do tratamento ^[83].

3.7.3.4. Outros fármacos antivirais

O fármaco Itraconazol quando administrado oralmente numa dose 10 mg/kg a cada 12 horas, demonstrou inibir o transporte de colesterol no serótipo I dos FeCoV *in vitro*, a estirpe selvagem dominante, sugerindo que inibe a replicação viral ^[84].

A ciclosporina A desempenha efeito imunossupressor ao liga-se às ciclofilinas celulares para inibir a transcrição de genes que codificam várias citocinas. Além disso também tem efeito antiviral, uma vez que a presença de ciclofilinas é necessária para a replicação de FeCoV e, ao ligar-se às ciclofilinas, a ciclosporina inibe a replicação de FeCoV *in vitro* e *in vivo* ^[85].

3.7.4. Monitorização do tratamento e prognóstico

Para monitorizar a resposta ao tratamento e a evolução da doença podem ser realizadas verificações regulares (a cada 7 a 14 dias) do hematócrito, das globulinas, do rácio A/G, da alfa-1 glicoproteína ácida e do peso do paciente. Caso o quadro clínico melhore, estes exames podem ser feitos mensalmente. A mensuração do título de anticorpos deve ser realizada a cada dois ou três meses, pois não são detetáveis diferenças num período de tempo inferior ^[86].

Está descrito que gatos que sofrem da forma efusiva da doença apresentam um tempo médio de sobrevivência de 21 dias. O tempo de sobrevivência em gatos com a forma não efusiva da PIF varia com os sinais clínicos. Os sinais neurológicos são os mais graves, sendo a sobrevivência média descrita nestes casos de 38 dias. A manifestação clínica com o melhor prognóstico parece ser a adenopatia dos linfonodos mesentéricos ^[86].

Fatores associados a um mau prognóstico são o mau estado geral, trombocitopenia, linfopenia, anemia, icterícia, hiponatremia, hipocaliemia, AST elevada e a presença de efusões. Os fatores associados a um melhor prognóstico são a diminuição dos níveis de globulinas, aumento do rácio A/G, diminuição da alfa-1 glicoproteína ácida, o aumento do hematócrito e aumento do peso ^[86].

3.8. Prevenção e controlo

Atualmente, existe uma vacina intranasal comercialmente disponível nos EUA e em alguns países europeus, a *Felocell PIF*[®] (Zoetis, EUA). A vacina tem como objetivo provocar uma resposta imunitária local através da indução de IgA e imunidade mediada por células. No entanto, também induz o desenvolvimento de anticorpos sistémicos contra FeCoV, embora geralmente em baixos níveis. A indução da resposta imunitária pela vacinação é conseguida pela presença de um agente mutante do serotipo II. Contudo, a vacinação só é eficaz se for administrada antes da exposição ao FeCoV. Por isso, em locais endémicos, onde os gatinhos são infetados em tenra idade, a vacinação às 16 semanas pode ser tardia para prevenir a infeção ^[87].

Um fator que deve ser tido em consideração em relação à infeção por PIF é que esta só pode ser evitada através da prevenção da infeção por FeCoV. No entanto, dado que o FeCoV é um vírus muito contagioso, prevenir a infeção é um verdadeiro desafio, sobretudo em ambientes onde vivem vários gatos ^[57].

Em relação ao manejo dos gatos, uma possível estratégia a adotar será mantê-los em pequenos grupos de três ou menos por espaço e com troca limitada de animais. Antes da introdução de um novo gato no grupo existente, este deve realizar quarentena durante, pelo menos, três semanas ^[88].

A identificação dos gatos que excretam o vírus nas fezes e a sua separação dos restantes gatos pode ajudar a reduzir a taxa de transmissão. Esta identificação pode ser realizada por RT-PCR a partir de três amostras fecais recolhidas em intervalos de uma semana ^[89]. A deteção pontual de anticorpos séricos anti-FeCoV, em vez de RT-PCR nas fezes não é útil, porque alguns gatos sem anticorpos anti-FeCoV possuem RNA viral nas fezes ^[27].

Sabendo que o FeCoV é transmitido predominantemente por via fecal-oral, a infeção é mantida nas populações de gatos, principalmente pelas fezes das caixas de areia. Deste modo, devem ser fornecidas caixas de areia suficientes (mais uma do que o número de gatos), as quais devem ser limpas pelo menos duas vezes por dia e os utensílios usados para recolher as fezes devem ser limpos e desinfetados diariamente ^[88]. Embora a excreção na saliva seja rara, os recipientes de comida e água devem ser limpos e desinfetados com detergentes contendo hipoclorito de sódio ^[40].

Um estudo publicado por *Addie et al* (2020) descreveu o uso oral de um nucleosídeo analógico, denominado *Mutian X*. A administração do *Mutian X* durante quatro dias numa dose oral de 4 mg/kg, a cada 24 horas, mostrou ser eficaz para parar a excreção fecal de FeCoV. Um potencial problema desta abordagem prende-se com o facto de ser um vírus comum nas populações de gatos e poder ser transportado em fomites. Contudo, se for aplicado juntamente com medidas de higiene supracitadas e o alojamento de gatos em pequenos grupos, pode ser útil no controlo da infeção ^[90].

4. Contribuição do rácio A/G e Δ TCN das efusões cavitárias para o diagnóstico de Peritonite Infeciosa Felina – estudo retrospectivo.

4.1. Introdução e objetivos

Durante o estágio curricular na área de diagnóstico citológico, o transudado modificado foi o tipo de efusão mais frequente na espécie felina. Cerca de 55% das efusões desta natureza foram submetidas a análise RT-PCR para pesquisa do vírus da PIF.

Atualmente, o diagnóstico definitivo da PIF é realizado através da histopatologia e imunohistoquímica das lesões características desta infeção. Contudo, estes exames são muito pouco requisitados na rotina do L.V. INNO, pois são escassas as situações em que os tutores pretendem avançar para a sua realização, ou por questões financeiras ou por relutância em realizar procedimentos invasivos nos gatos debilitados. As poucas ocasiões em que se realizam tais exames são após a morte dos animais. Porém, é mais vantajoso possuir uma elevada certeza da PIF estando os gatos ainda vivos para que possa ser iniciada a terapia adequada o mais brevemente possível. Com este propósito, o L.V. INNO, disponibiliza um perfil analítico denominado "PIF forma efusiva", o qual engloba a análise completa das efusões e o teste RT-PCR nas mesmas, por forma a aferir com maior certeza a presença da infeção.

Apesar de não existirem características bioquímicas e celulares nas efusões que permitam o diagnóstico definitivo da PIF, este torna-se mais provável quando as efusões apresentam características inflamatórias na citologia e, além disso, possuem rácios A/G inferiores a 0,9 e delta das células totais nucleadas (Δ TCN) superior ou igual a 2,5.

No âmbito do presente relatório de estágio, foi realizado um estudo que teve como principal objetivo averiguar o contributo do rácio A/G e Δ TCN das efusões cavitárias, na discriminação de gatos clinicamente suspeitos de PIF, usando como critério de diagnóstico, resultados de RT-PCR positivos nas efusões. Este estudo possuiu também como objetivos:

- Caracterizar a população felina das amostras em estudo;
- Caracterizar a população de gatos positivos no diagnóstico de PIF;
- Caracterizar as efusões de gatos positivos no diagnóstico de PIF;
- Caracterizar as efusões de gatos com RT-PCR negativo.

4.2. Materiais e métodos

4.2.1. Tipo de estudo

Foram analisados todos os casos de efusões cavitárias com suspeita clínica de PIF recebidos no L.V. INNO no período compreendido entre janeiro de 2017 a março de 2021. Deste modo, o estudo realizado foi essencialmente do tipo retrospectivo, contendo também uma pequena parte prospetiva, na medida em que alguns dados foram obtidos durante o período de estágio.

Sendo, na sua maioria, um estudo retrospectivo, não foi possível assistir a todos os procedimentos analisados, no entanto, pressupõe-se que foi utilizada a mesma metodologia nos diferentes procedimentos.

Assim, o estudo foi dividido em três partes:

- Na primeira parte procedeu-se à seleção das amostras de efusões. Para tal foi recolhida informação de uma base de dados informatizada, o *Clinidata XXI*[®] (Maxdata Software, Portugal). Esta pesquisa permitiu também a caracterização da população felina em termos de sexo, idade e raça.
- Na segunda parte foram organizados e caracterizados os dados obtidos a partir do estudo completo das efusões, o qual compreendeu, numa primeira fase, a análise bioquímica, a determinação da contagem celular, a avaliação citológica e classificação da efusão. Numa segunda fase as amostras foram submetidas a RT-PCR em tempo real para pesquisa do vírus da PIF.
- Na terceira parte foi determinada a sensibilidade, a especificidade e os respetivos valores de *cut-off* para o rácio A/G e Δ TCN, determinados nas efusões. Foram ainda determinados os valores preditivos positivos e negativos para os referidos parâmetros.

4.2.2. População e amostra

Definiu-se como população-alvo de estudo todas as amostras de efusões de gatos com suspeita clínica de PIF, submetidas para análise ao L.V. INNO. Dentro desta população a amostra foi selecionada de acordo com os seguintes critérios de inclusão:

- Registo epidemiológico (idade, raça, género);
- Realização do estudo completo de efusão;
- Realização de posterior diagnóstico molecular por RT-PCR.

Após a seleção dos animais segundo os critérios acima referidos, foram excluídas as amostras em que não foram determinados, pelo menos, um dos parâmetros analisados nas efusões, amostras cujo resultado da citologia e/ou do RT-PCR tenha sido inconclusivo e amostras com escassa informação epidemiológica. Com base nestes critérios, os gatos foram considerados afetados pela PIF, se as características das efusões mostravam ser consistentes com a doença, assim como um resultado de RT-PCR positivo. Inversamente, os gatos foram considerados como não afetados pela PIF, se o resultado do RT-PCR fosse negativo, mesmo que as características da efusão mostrassem ser consistentes com a doença.

A amostra final reuniu efusões de 41 gatos, de ambos os sexos, de diferentes raças, com idades entre os quatro meses e os 15 anos.

4.2.3. Análise das efusões

A colheita das amostras das efusões foi realizada nos respectivos Centros de Atendimento Médico-veterinários, para dois tubos diferentes: tubo seco estéril e tubo com anticoagulante de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), ambos com três a cinco mililitros de volume. As amostras foram posteriormente enviadas para o L.V. INNO juntamente com as fichas de requisição, onde constavam a solicitação da sua análise completa e o respectivo teste RT-PCR.

As efusões foram sujeitas a avaliação bioquímica - determinação da concentração total de proteínas (PT), albumina, globulinas e rácio albumina/globulinas (A/G) - e avaliação celular - determinação da contagem total de células nucleadas (CTCN), delta (Δ) TCN e citologia.

As efusões foram classificadas de acordo com os critérios estabelecidos na **Tabela 7**. Se existisse disparidade na classificação, o valor das PT era o critério mais importante na diferenciação de transudatos e transudatos modificados, e a celularidade era o critério mais importante na separação de transudatos modificados e exsudatos.

Tabela 7 - Classificação das efusões com base nas proteínas totais, CTCN e avaliação citológica.

Tipo de Efusão	Proteínas Totais (g/dL)	CTCN (células/ μ l)	Tipos celulares	Características especiais
Transudado	< 2,5	< 1000	Mononucleadas	Baixa celularidade
Transudado modificado	2,5-7,5	1000-7000	Mononucleadas	Tipo celular varia com a etiologia
Exsudado séptico	> 3,0	> 7000	Neutrófilos	Neutrófilos degenerados
Exsudado não séptico	> 3,0	> 7000	Neutrófilos	Neutrófilos não degenerados

Adaptado de Dempsey & Ewing (2011) ^[20]

4.2.4. Quantificação proteica

As amostras em tubos secos foram centrifugadas a 3500 rotações durante 10 minutos, na centrífugadora *Kubota 5400*[®] (*Kubota Corporation*, Japão). Em seguida, realizou-se a separação do sobrenadante para novos tubos secos estéreis, sendo os precipitados descartados. Sempre que a análise não era realizada de imediato, os tubos eram refrigerados a quatro graus Celsius.

A quantificação proteica nas efusões foi efetuada a partir de amostras contidas em tubos sem anticoagulante. Após a centrifugação das amostras e separação do sobrenadante, estas foram colocadas no analisador bioquímico *Cobas*[®] 6000 módulo c501 (*Roche*, Alemanha), o que permitiu a determinação direta das PT e albumina através de espectrofotometria de absorvância por métodos colorimétricos.

A técnica referida consistiu na:

- Passagem de um feixe de luz (com um determinado comprimento de onda) na direção dos tubos onde se encontravam as amostras a analisar;
- Medição da absorvância (quantidade de luz absorvida no espectro da luz visível) e determinação da concentração das amostras;
- Junção de um substrato (no caso das PT foi o biureto; no caso da albumina foi o verde de bromocresol) às amostras, na respetiva cuvete do aparelho;
- Conversão do substrato em produto e medição da sua absorvância.
- A intensidade da cor correspondeu à concentração das proteínas (às PT corresponde uma cor púrpura e à albumina corresponde uma cor azul-esverdeada).

A quantificação das globulinas foi feita por cálculo, pela subtração do valor da albumina ao das PT. O rácio A/G foi determinado através da divisão do valor da albumina pelo valor das globulinas. Estes parâmetros foram determinados de forma automática pelo *Clinidata xxi*[®] (*Maxdata Software*, Portugal).

4.2.5. Contagem celular

A quantificação celular foi efetuada a partir das amostras contidas em tubos com EDTA. Antes de serem analisadas foram previamente homogeneizadas durante pelo menos 10 minutos em *Nutating Mixer*[®] (VWR, Estados Unidos da América). Sempre que a análise não era realizada de imediato, os tubos eram refrigerados a quatro graus Celsius.

. Depois de homogeneizadas, as amostras foram colocadas no equipamento automático de hemocitometria de fluxo *Sysmex XT – 2000iV*[®] (*Sysmex Corporation, Kobe, Japão*), para determinar a contagem total de células nucleadas (CTCN), que corresponde ao número total de leucócitos, e o Δ TCN.

A metodologia deste equipamento consistiu em:

- Diluir as células presentes nas amostras;
- Corar as células com uma substância fluorescente (a polimetina);
- Passagem das células através de dois canais diferentes: o canal WBC-DIFF (canal de realiza a contagem celular diferencial) e o canal WBC-BASO (canal que realiza a contagem das células resistentes à lise);
- Emissão de um feixe de luz laser aquando da passagem das células por esses dois canais;
- A CTCN corresponde ao total de leucócitos é determinada pela descontinuidade na passagem da luz laser nesses dois canais;
- O valor do Δ TCN corresponde ao rácio entre as contagens celulares obtidas pelos dois canais WBC (DIFF/BASO) do equipamento.

4.2.6. Citologia das efusões

A avaliação citológica das amostras de efusões foi efetuada a partir das amostras preservadas em tubos de EDTA. As preparações citológicas foram realizadas com a técnica de espalhamento tipo esfregaço sanguíneo quando a CTCN das amostras era superior a 1000 células/ μL . Caso a CTCN estivesse entre 500 e 1000 células/ μL , procedeu-se à centrifugação de um mililitro da amostra a 1000 rotações durante cinco minutos na *Kubota 5400*[®] (*Kubota Corporation*, Japão). De seguida desprezou-se o sobrenadante, ressuspendeu-se e utilizou-se o sedimento para o espalhamento na lâmina, aplicando a técnica de *squash*. Quando o nível celular das amostras mostrou ser muito baixo (inferior a 500 células/ μL) realizou-se a sua citocentrifugação. Para tal, pipetou-se um pouco da amostra (menos de um mililitro) diretamente para o sistema de citocentrifugação, como exposto na **Figura 18**. O sistema foi centrifugado a 1000 rotações durante cinco minutos, concentrado o sedimento na lâmina.

A preparações citológicas obtidas pelos métodos referidos no parágrafo anterior foram coradas com corantes tipo *Romanovski*, nomeadamente *Diff-Quick*[®].

Para avaliar o tipo e morfologia celular usou-se um microscópio *Eclipse 600*[®] (*Nikon*, Japão) com objetivas planacromáticas de 100x, 200x, 400x, 500x e 1000x.

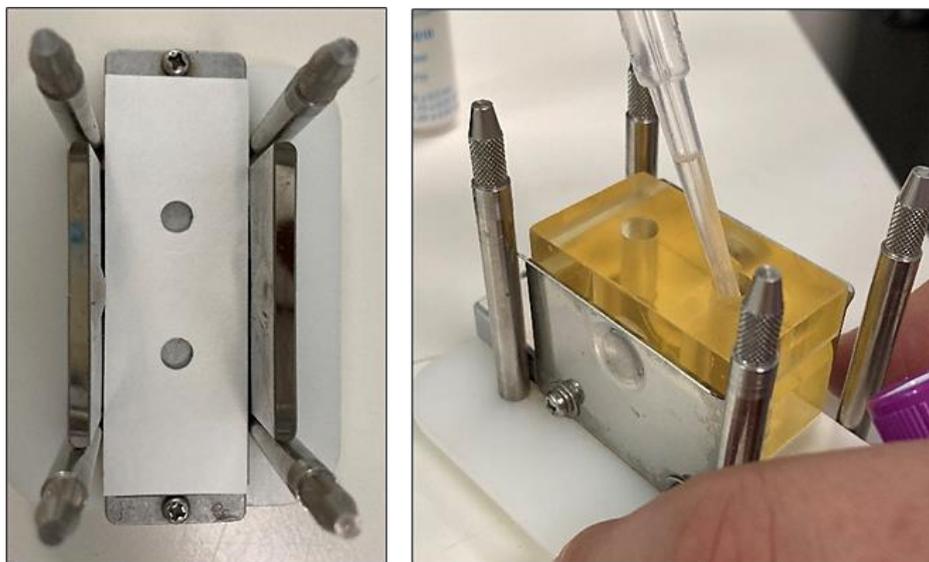


Figura 18 - Sistema de citocentrifugação. Fotografias originais da autora captadas durante o estágio no L.V. INNO.

4.2.7. Diagnóstico por RT-PCR

Todas as amostras de efusões foram sujeitas a análise molecular no Laboratório Veterinário IDEXX (*Laboratories, Inc*, Estados Unidos da América), para confirmação da infecção pelo vírus da PIF. A evolução dos métodos de diagnóstico definitivos disponíveis, nomeadamente a introdução do PCR em tempo real do vírus mutado, ainda que não seja o *gold standard* para o diagnóstico da infecção, apresenta uma sensibilidade e especificidade elevadas [91]. Para identificar o material genético viral, foram utilizados três testes de RT-PCR em tempo real, em paralelo:

- Um teste *FeCoV Real RT-PCR™*, para detetar o gene que codifica a proteína acessória 7b e quantificar a carga viral;
- Dois testes *PIFV Real RT-PCR™* para detetar mutações associadas o biótipo PIF.

Os testes *PIFV Real RT-PCR™* basearam-se na utilização de sondas de hidrólise altamente específicas para detetar as mutações nas posições de aminoácidos 1058 e 1060 do gene que codifica a proteína da espícula. Paralelamente foram detetadas sequências de tipos selvagens. As mutações foram detetadas com base numa abordagem de identificação alélica multiplexada, ou seja, numa única reação de RT-PCR foi possível realizar a amplificação e deteção de várias sequências genéticas em simultâneo, neste caso do tipo selvagem e das referidas mutações. Na **Tabela 8** estão expostos os resultados possíveis do teste *PIFV Real RT-PCR™* e respetiva interpretação.

Tabela 8 - Resultados possíveis do teste de RT-PCR em tempo real e respetiva interpretação.

Resultado	Interpretação
PIF	O FeCoV transformou-se no biótipo PIFV.
FECV	O FeCoV não sofreu mutação e é improvável que o gato tenha PIF.
Biótipo misto	Tanto o biótipo FECV como o biótipo PIF estão presentes na amostra.
Biótipo indeterminado	Amostra com alta carga viral FeCoV. No entanto, o FeCoV não pôde ser tipificado, pelo que o PIF não pôde ser confirmado.
Abaixo do limite de deteção	O FeCoV não pôde ser tipificado, porque não havia partículas virais suficientes.

Adaptado de IDEXX *PIF Virus RealPCR™* (2016) [91]

4.3. Análise estatística

Após a recolha de todos os dados clínicos e laboratoriais de cada amostra, procedeu-se à sua organização utilizando o programa *Microsoft Excel*[®] 2016 (*Microsoft, Portugal*). Neste programa realizou-se a estatística descritiva, nomeadamente o cálculo da mediana, frequência absoluta (Fi) e frequência relativa (Fr (%)). Os resultados foram apresentados em gráficos e tabelas de modo a facilitar a sua interpretação.

De forma a avaliar o poder discriminatório do rácio A/G e Δ TCN na população clinicamente suspeita de PIF, foram determinadas a sensibilidade (Se), a especificidade (Es), o valor preditivo positivo (VPP) e o valor preditivo negativo (VPN) destes parâmetros. Para tal, foi utilizado o programa estatístico *MedCalc*[®] (*Software MedCalc, versão 20.009*). O programa estatístico permitiu:

- Determinar a Se (proporção de indivíduos com RT-PCR positivo na população em estudo e que possuem a doença) e Es (proporção de indivíduos com RT-PCR negativo na população em estudo e que não possuem a doença) com recurso às fórmulas matemáticas padronizadas: [Se= verdadeiros positivos/ (verdadeiros positivos + falsos negativos)] e [Es= verdadeiros negativos/ (verdadeiros negativos + falsos positivos)].
- Determinar o VPP (probabilidade de o gato ter PIF quando o RT-PCR é positivo) e o VPN (probabilidade de o gato não ter PIF quando o RT-PCR é negativo) através das seguintes fórmulas matemáticas padronizadas: [VPP= sensibilidade x prevalência/ (sensibilidade x prevalência + (1-especificidade) x (1-prevalência))] e [VPN= especificidade x (1-prevalência) (1-sensibilidade) x prevalência + especificidade x (1-prevalência)].
- Conceber as *Receiver Operating Characteristic Curves* (ROC), a área por baixo da curva (AUC) e o nível de significância (*p-value ou P*) para o rácio A/G e Δ TCN.
- Determinar o valor de *cut-off* ideal (valor que otimiza a sensibilidade e especificidade) do rácio A/G e Δ TCN, através do *Youden Index* (*J*), que corresponde à seguinte fórmula matemática: $J = \text{sensibilidade} + \text{especificidade} - 1$.

Os valores da sensibilidade, especificidade, assim como a AUC foram obtidos usando um intervalo de confiança de 95%, determinado pelo método de *Clopper- Pearson* e exato binomial, respetivamente. Para determinar o VPP e o VPN, foi usada uma prevalência da doença de 66% (percentagem de resultados positivos do RT-PCR em tempo real) e um intervalo de confiança de 95% dado por *Mercaldo et al* (2007) ^[92].

4.4. Resultados

4.4.1. Caracterização da população felina das amostras estudadas

Foram incluídas na população do estudo amostras de efusões cavitárias de 41 gatos com suspeita clínica de PIF, dos quais 25 eram fêmeas (Fr=61%) e os restantes 16 eram machos (Fr=39%).

Relativamente à idade, os 41 gatos foram divididos em três grupos, representados no **Gráfico 11**. Verifica-se que a maioria dos gatos tem idade inferior ou igual a três anos. A idade dos animais variou entre os quatro meses e os quinze anos, com uma média de 3,1 anos e mediana de um ano.

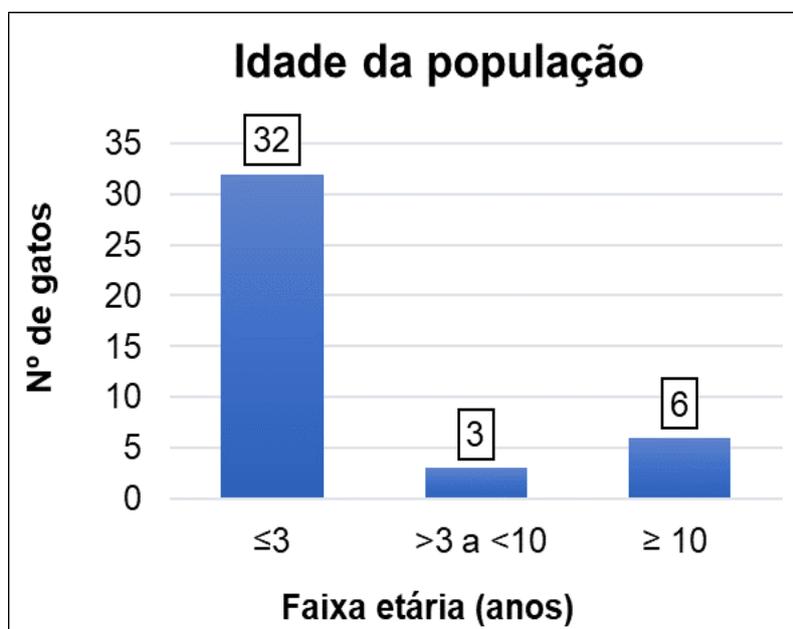


Gráfico 11 - Distribuição dos gatos por faixa etária, expressa em F_i , $n=41$.

Relativamente aos animais correspondentes a cada raça (**Gráfico 12**), observamos que a maioria correspondeu a *Europeu Comum* (22 gatos, 54 %) e também de raça *Persa* (quatro gatos, 10 %). Nas restantes raças observou a seguinte distribuição: dois gatos da raça *Scottish Fold* (4,75%); dois gatos da raça *British Shorthair* (4,75%); dois gatos da raça *Bosques da Noruega* (4,75%); dois *Sphynx* (4,75%). Observaram-se ainda alguns animais *Sem Raça Definida* (sete gatos, 17%).

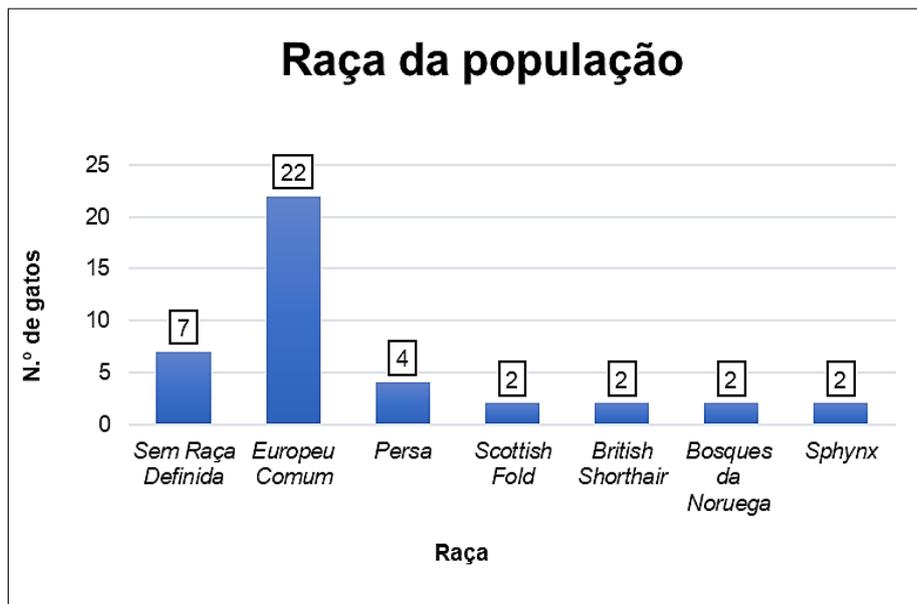


Gráfico 12 - Distribuição dos gatos por raça, expressa por F_i ($n=41$).

4.4.2. Diagnóstico molecular de PIF

Todas as amostras de efusões incluídas neste estudo foram submetidas a RT-PCR em tempo real para confirmação da infecção pelo vírus da PIF. Este exame revelou um resultado positivo em 66% das amostras, o que se traduziu pela presença de infecção em 27 gatos. Em relação os resultados negativos, estes ocorreram em 14 gatos, correspondendo a 34% das amostras. Nos resultados positivos foram incluídas as amostras de efusões em que o RT-PCR detetou o biótipo PIFV e o biótipo misto. Os resultados negativos incluíram as amostras de efusões em que o resultado revelou um biótipo indeterminado, abaixo do limite de deteção e os casos em que foi detetado apenas o biótipo FECV.

Nas 27 amostras de efusões positivas, o RT-PCR em tempo real também permitiu detetar a presença de mutações, particularmente no gene que codifica a proteína da espícula. Pode-se verificar pelo **Gráfico 13** que o tipo de mutação predominante foi na posição 1058, onde a metionina (M) mudou para Leucina (L), tendo ocorrido em 17 amostras (Fr= 63%). Em 10 amostras (Fr= 37%) a serina (S) mudou para alanina (A), na posição 1060.

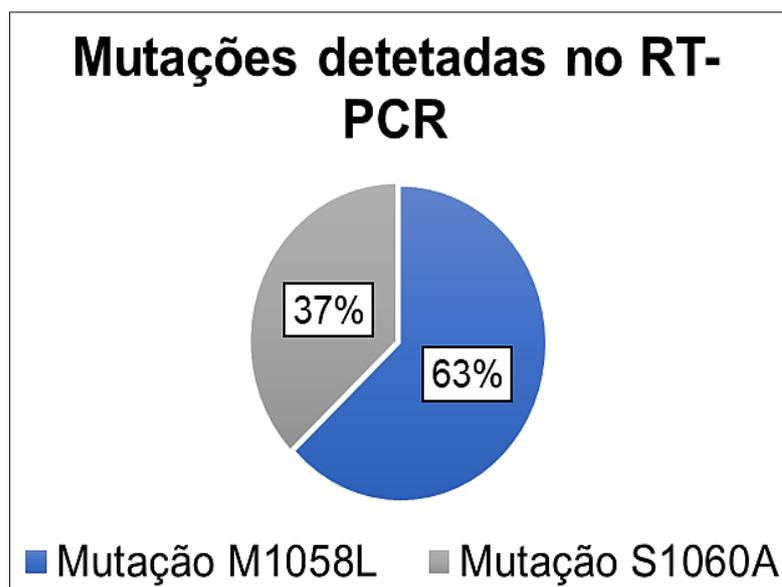


Gráfico 13 - Distribui o das muta es detetadas no RT-PCR em tempo real na popula o, expressa por Fr (%) (n=41).

4.4.3. Caracterização da população de gatos com PIF

Dos 27 gatos com PIF, 14 (52%) pertenciam ao género masculino e 13 (48%) ao género feminino. A idade dos pacientes encontrava-se compreendida entre os 0,25 anos (quatro meses) e os 14 anos, o que resultou numa idade média de 1,73 anos e numa mediana de 0,92 anos (aproximadamente 11 meses), tal como se pode aferir pela observação da **Tabela 9**.

Tabela 9 - Média e mediana da idade dos gatos com PIF.

Idade (anos)	
Média	1,73
Mediana	0,92
Máximo	14,00
Mínimo	0,25

Relativamente à raça dos gatos com diagnóstico positivo, pelo **Gráfico 14** verificou-se que a mais frequente foi a *Europeu Comum*, à qual pertenceram 15 animais (56%). Nas restantes raças observou-se a seguinte distribuição: três gatos de raça *Persa* (11%); um gato da raça *Scottish Fold* (4%); dois gatos da raça *British Shorthair* (7%); um gato da raça *Bosques da Noruega* (4%); dois gatos da raça *Sphynx* (7%). Apenas três gatos com PIF (11%) não tinham raça definida.

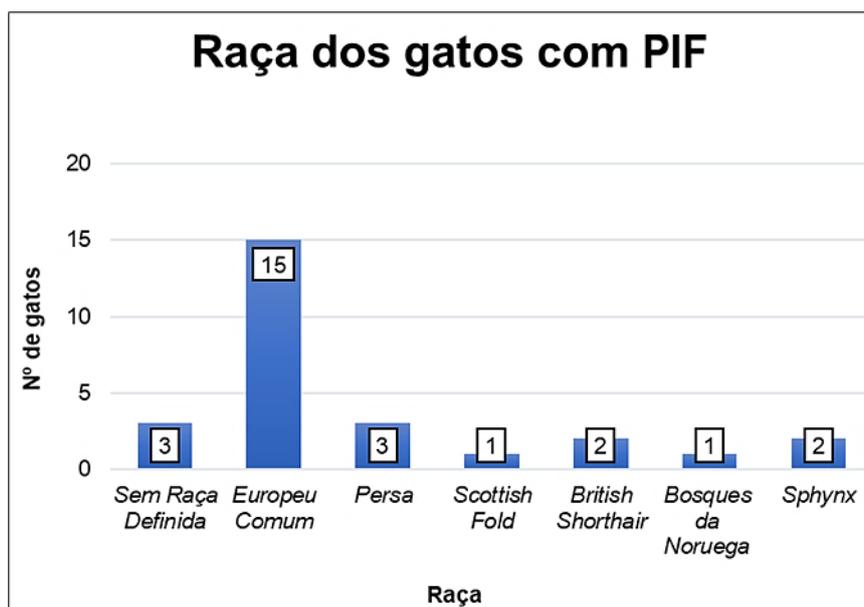


Gráfico 14 - Distribuição da raça dos gatos com PIF, expressa por F_i ($n=27$).

4.4.4. Caracterização das efusões dos gatos com PIF

Após a identificação dos gatos com RT-PCR positivo, apurou-se que 70% (19 gatos) possuíam efusões classificadas como transudado modificado e os restantes 30% (oito gatos) apresentavam efusões classificadas como exsudado não séptico.

Foi elaborada a **Tabela 10** onde estão representados os valores mínimo, máximo e a mediana dos parâmetros determinados nas efusões dos gatos diagnosticados com PIF.

Tabela 10 – Mediana, valor mínimo e valor máximo dos parâmetros analisados nas efusões dos gatos com PIF.

Parâmetro Analisado	Mediana	Mínimo - Máximo
Proteínas Totais (g/dL)	5,27	3,32 - 10,90
Albumina (g/dL)	1,91	1,24 - 2,58
Globulinas (g/dL)	3,36	1,96 - 8,55
Rácio A/G	0,54	0,28 - 0,88
CTCN (células/ μ L)	3594	1 - 57300
Δ TCN	8,10	0,70 - 71,10

Verificou-se que, as PT das efusões dos 27 gatos com PIF apresentaram uma mediana de 5,27 g/dL. Em 26 gatos com PIF (96%) o valor das PT foi superior a 3,5 g/dL (valores compreendidos entre 3,64 e 10,90). A quantidade de globulinas nas efusões dos gatos com PIF revelou ser consideravelmente superior em relação à quantidade de albumina. Este facto traduziu-se, como seria de esperar, num rácio A/G baixo, com uma mediana de 0,54. Todos os gatos com diagnóstico positivo apresentaram rácio A/G inferior ou igual a 0,88. Destes, 24 (89%) tinham rácio A/G inferior a 0,8 (valores compreendidos entre 0,28 e 0,71). A CTCN nas efusões dos 27 gatos com PIF revelou uma mediana de 3594 células/ μ L. Em 19 gatos com PIF (70%) a CTCN na efusão foi inferior a 7000 células/ μ L (valores compreendidos entre uma e 6103 células/ μ L). Em oito gatos com PIF (30%) a contagem TCN na efusão foi superior a 10000 células/ μ L (valores compreendidos entre 12793 e 57300 células/ μ L). O Δ TCN das efusões dos gatos com PIF apresentou uma mediana de 8,10. Vinte e um gatos com PIF (78%) o Δ TCN da efusão foi superior a 2,5 (valores compreendidos entre 3,1 e 71,1). Averiguou-se ainda que, nos restantes seis gatos com PIF (22%), o Δ TCN foi inferior ou igual a 1,7.

4.4.5. Caracterização das efusões com RT-PCR negativo

Após a identificação dos gatos com RT-PCR negativo, verificou-se que 50% (sete gatos) possuíam efusões compatíveis com transudado modificado, 42,9% (seis gatos) apresentavam efusões compatíveis com exsudado não séptico e apenas um gato exibiu exsudado séptico (7,1%). Dos 14 gatos negativos, não foi possível determinar a etiologia subjacente ao desenvolvimento da efusão em 11 (85,7%). Assim foi possível a suspeita da etiologia subjacente em dois pacientes (14,3%). Sendo estes, casos de desenvolvimento de exsudado não séptico, devido a massa mediastínica inespecífica. Foi possível um diagnóstico definitivo da etiologia subjacente num paciente (5,9%), sendo a efusão compatível com piotórax.

Foi elaborada a **Tabela 11** onde estão representados os valores mínimo, máximo e mediana, dos parâmetros determinados nas efusões dos gatos com RT-PCR negativo.

Tabela 11 - Mediana, valor mínimo e valor máximo dos parâmetros analisados nas efusões dos gatos sem PIF.

Parâmetro Analisado	Mediana	Mínimo - Máximo
Proteínas Totais (g/dL)	4,56	2,81 - 7,36
Albumina (g/dL)	1,94	1,10 - 3,09
Globulinas (g/dL)	2,10	1,20 - 5,55
Rácio A/G	1,04	0,33 - 1,93
CTCN (células/ μ L)	5667	293 - 116130
Δ TCN	1,30	0,60 - 10,60

Pode constatar-se que as PT das efusões dos 14 gatos com PIF apresentaram uma mediana de 4,56 g/dL (valores compreendidos entre 2,81 e 7,36). A quantidade de globulinas nas efusões dos gatos com RT-PCR negativo nem sempre revelou ser superior em relação à quantidade de albumina. Este facto, traduziu-se num rácio A/G com uma mediana de 1,04. A CTCN nas efusões dos gatos com RT-PCR negativo revelou uma mediana de 5667 células/ μ L (valores compreendidos entre 293 e 116130). O Δ TCN das efusões dos gatos com RT-PCR negativo apresentou uma mediana de 1,30 (valores compreendidos entre 0,60 e 10,60).

4.5.6. Dados estatísticos sobre o Rácio A/G e Δ TCN das efusões

Os gráficos das curvas ROC permitiram relacionar a sensibilidade com a proporção de falsos positivos (100-especificidade) para todos os valores de *cut-off* do rácio A/G e do Δ TCN determinados nas amostras de efusões, tal como mostra o **Gráfico 15**. A área sob a curva ROC (AUC) permitiu avaliar a capacidade que cada parâmetro tem para distinguir os gatos com PIF e os gatos sem a doença. Quanto mais próxima a curva ROC estiver do canto superior esquerdo, maior é a AUC e maior é o poder discriminatório do parâmetro. A AUC para o Δ TCN foi de 0,811. Para o rácio A/G a AUC foi 0,746.

Foi também determinado o nível de significância (P) para cada parâmetro, que permitiu saber a probabilidade de estes parâmetros detetarem gatos com PIF, quando não há diferença na distribuição da população de gatos com PIF e gatos sem PIF, ou seja, quando a área sob a curva ROC é de 0,5 (hipótese nula, que coincide com a reta diagonal). Neste caso, o valor de P mostrou ser pequeno ($P < 0,05$), tanto para o rácio A/G ($P = 0,009$) como para o Δ TCN ($P < 0,001$), o que significa que é pouco provável a hipótese nula se verifique.

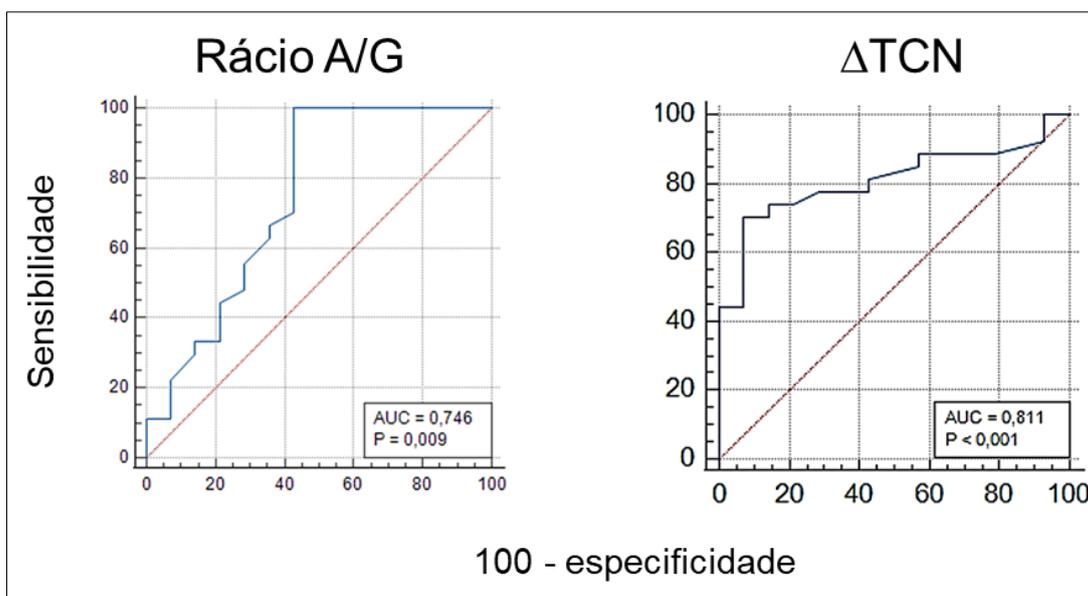


Gráfico 15 - Curvas ROC do rácio A/G (esquerda) e do Δ TCN (direita), obtidas pelo programa MedCalc® (Software MedCalc, versão 20.009).

A realização das curvas ROC permitiu determinar valores *cut-off* do rácio A/G e do Δ TCN importantes na discriminação de gatos com PIF e gatos com RT-PCR negativo. A aplicação do *Youden Index* permitiu selecionar o valor *cut-off* ideal para o rácio A/G e para o Δ TCN, de forma otimizar a sensibilidade e especificidade destes dois parâmetros. O valor de *cut-off* ideal corresponde ao ponto da curva ROC mais afastado acima da reta diagonal. Para o rácio A/G o *cut-off* foi 0,88 (**Tabela 12**). Os valores preditivos positivos e negativos associados a este *cut-off* foram de 0,82 e 1, respetivamente. Para o Δ TCN o *cut-off* ideal foi de 4,9 (**Tabela 13**). Os valores preditivos positivos e negativos associados a este *cut-off* foram de 0,95 e 0,62, respetivamente.

Tabela 12 - Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN) dos diferentes valores *cut-off*, para o rácio A/G, num intervalo de confiança de 95%.

<i>Cut-off</i>	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	VPP	VPN
< 0,32	11,11	100,00	1,00	0,37
≤ 0,40	33,33	85,71	0,81	0,40
≤ 0,51	48,15	71,43	0,77	0,42
≤ 0,64	70,37	57,40	0,76	0,50
≤ 0,88	100,00	57,40	0,82	1,00

Tabela 13 - Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN) dos diferentes valores *cut-off*, para o Δ TCN, num intervalo de confiança de 95%.

<i>Cut-off</i>	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	VPP	VPN
> 10,6	44,44	100,00	1,00	0,48
>4,9	70,37	92,86	0,95	0,62
>2,9	77,78	71,43	0,84	0,62
>1,7	77,78	57,14	0,78	0,57
>0,6	100,00	7,14	0,68	1,00

5. Discussão

5.1. Caracterização da população

O RT-PCR em tempo real permitiu averiguar que a percentagem de PIF na população suspeita foi de 66%, traduzida por um resultado positivo no RT-PCR em 27 dos 41 gatos suspeitos.

Neste estudo não se averiguou uma diferença percentual significativa da doença de acordo com o género do paciente, em virtude de os machos representarem 52% (14 animais) e das fêmeas 48% (13 animais) dos casos positivos no RT-PCR. Ainda assim, como as fêmeas estavam representadas em maior número na população inicialmente suspeita (61% de fêmeas), um maior número de casos de PIF em gatos machos, sugere uma possível predisposição do género masculino para o desenvolvimento de PIF. Estes resultados corroboram o estudo retrospectivo efetuado na Austrália por *Worthing et al* (2012) ^[37], no qual se verificou que dos 382 gatos com PIF, 233 (61%) correspondiam a machos, estando estes significativamente sobre-representados em relação à população felina, tendo em conta estudos demográficos realizados anteriormente por *Toribio et al* (2009) ^[93]. Uma possível explicação para este facto pode ser a influência negativa das hormonas sexuais, nomeadamente os andrógenos, na resposta imunitária mediada por células. Os androgénios ao afetarem a resposta dos linfócitos T, podem potencialmente aumentar a multiplicação do vírus nos monócitos e macrófagos, aumentando assim o risco de mutações do genoma viral que se pensa serem a causa de PIF ^[32].

Neste estudo, a idade média dos gatos com PIF foi de 1,7 anos e a mediana foi de 11 meses. Cerca de 81% dos gatos com PIF apresentou idade inferior ou igual a dois anos. Estes resultados estão de acordo com vários estudos que mostraram que a PIF está significativamente associada à idade dos gatos, sendo os gatos jovens mais suscetíveis ^[32] ^[37]. *Yin et al.*(2021) mostraram que cerca de 90% dos gatos com PIF tinha idade inferior ou igual a dois anos ^[94]. Os gatos jovens têm sistemas imunitários imaturos e, quando expostos a situações de stress como o desmame, a castração, vacinação e o realojamento, as suas defesas imunitárias podem ficar ainda mais comprometidas. Os gatinhos têm também uma maior prevalência de infeção por agentes patogénicos entéricos (p. ex., *Toxocara spp.* e *Giardia spp.*), podendo estes contribuir de alguma forma para a replicação de FeCV, eventualmente facilitar a replicação descontrolada do FeCoV nos macrófagos e, portanto, levar ao desenvolvimento de PIF ^[37]. Não se descarta a possibilidade de os gatinhos deste estudo serem provenientes de abrigos, gatis de reprodução ou lojas de animais e tenham contactado com múltiplos gatos, o que aumentou o risco de infeção por FeCoV ou por outros vírus imunossupressores como o FIV ou FELV, que podem levar ao desenvolvimento de PIF. Ainda em relação à idade, segundo *Sykes et al* (2014) gatos com faixa etária igual ou superior a 10 anos estão predispostos à doença por terem um sistema imunitário mais enfraquecido ^[95]. No presente estudo verificou-se um caso de PIF num gato com 14 anos.

Dentro da população analisada, verificou-se que os animais de raça pura foram os mais afetados pela doença. Dos 27 gatos com PIF, 24 (89%) eram de raça pura. Na literatura está descrito que a raça é um fator de risco para o desenvolvimento de PIF. Contudo a predisposição racial varia geográfica e temporalmente dependendo das preferências dos criadores das regiões, o que se reflete na diferença de raças entre os estudos [95]. No estudo de *Worthing et al* (2012), citado anteriormente, a raça foi considerada como fator de risco de PIF, tendo sido demonstrado que 60% dos casos de PIF observados correspondiam a gatos de raça pura, sendo as raças mais afetadas *Devon Rex*, *British Shorthair* e *Abissínia* [37]. No presente estudo, a raça *Europeu Comum* foi a mais frequente com PIF, sendo 15 gatos (56%) desta raça. A predisposição da raça *Europeu Comum* para o desenvolvimento de PIF estará provavelmente mais relacionada com a sua sobre-representação na população felina em Portugal, do que a predisposição desta raça em particular. Em contraste, estudos publicados por *Riemer et al* (2016) e *Yin et al* (2021), mostraram que não existe predisposição para gatos de raça desenvolverem PIF [32] [94].

5.2. Caracterização das efusões

Segundo *Thrall* (2020), o processo inflamatório que ocorre na PIF liberta substâncias quimiotáticas e produtos vasoativos que aumentam a permeabilidade vascular, causando a migração de fluido, rico em proteínas de elevado peso molecular, do espaço intravascular para uma cavidade [96].

De acordo com a literatura, as efusões de gatos com PIF têm tipicamente um elevado teor proteico (> 3,5 g/dL) e uma concentração de globulinas consistentemente maior do que a concentração de albumina. Estes valores são um reflexo do que ocorre a nível sérico, nomeadamente a hipergamaglobulinémia [20] [96]. Esta diferença na concentração de albumina e globulinas produz um rácio A/G baixo, geralmente inferior a 0,9, nas efusões [65] [68]. Segundo alguns autores, as efusões de PIF possuem geralmente uma CTCN inferior a 6000 células/ μ L, [20],[91]. Tendo em conta estes critérios, as efusões causadas pela PIF muitas vezes enquadram-se na classificação histórica de transudado modificado [20] [96]. No presente estudo verificou-se que 19 das 27 efusões de PIF (70%) se encaixaram nesta classificação, com PT entre 3,32 e 10,9 g/dL, rácios A/G entre 0,28 e 0,88 e CTCN entre uma e 6103 células/ μ L.

Ainda no presente estudo verificou-se que, oito das 27 efusões de PIF (30%) encaixaram-se na classificação de exsudados não séticos, com PT entre 4,9 e 9,6 g/dL, rácios A/G entre 0,32 e 0,7 e CTCN entre 12793 e 57300 células/ μ L. Uma possível explicação para tais resultados, poderá ser a evolução crónica destas efusões, sugerindo que a doença foi diagnosticada numa fase mais avançada. Com o passar do tempo, nas efusões tendem a acumular-se células inflamatórias em grande quantidade, fazendo com que uma efusão inicialmente classificada como transudado modificado passe a ser um exsudado [96].

5.3. Contributo do rácio A/G e Δ TCN

A partir das 41 amostras de efusões, o presente estudo permitiu avaliar a contribuição do rácio A/G e do Δ TCN para o diagnóstico da forma efusiva da PIF. Tal contribuição foi avaliada através da determinação do poder discriminatório destes parâmetros e determinação dos valores *cut-off* (a partir dos quais se consegue aumentar a suspeita da presença da PIF) dos mesmos, numa população de gatos com sinais clínicos.

Relativamente ao rácio A/G, o presente estudo demonstrou que este é estatisticamente significativo na discriminação entre gatos com PIF e gatos com RT-PCR negativo, tal como demonstrado pelo valor de *P* igual a 0,009 e AUC igual a 0,746.

Hartmann et al (2003) analisaram retrospectivamente os dados clínicos de 488 gatos, com o objetivo de avaliar a utilidade de vários testes no diagnóstico de PIF. Segundo tal estudo, o rácio A/G determinado nas efusões, mostrou ter um *cut-off* ideal inferior a 0,90, para a distinção entre gatos com PIF e gatos sem PIF. A este valor corresponderam uma sensibilidade de 86% e uma especificidade de 74% [65].

Os resultados do presente estudo enfatizam o estudo supracitado, na medida em que o *cut-off* ideal determinado pelo *Youden Index* nas efusões foi muito semelhante, neste caso inferior ou igual a 0,88. Todos os gatos com PIF do presente estudo apresentaram rácios A/G inferiores ou iguais a 0,88. Estes resultados refletiram-se numa sensibilidade mais elevada (100%) comparativamente com estudo supracitado. Todavia, no presente estudo, seis gatos com RT-PCR negativo tinham rácios inferiores a 0,88. Estes resultados refletiram-se numa especificidade mais baixa (57,4%), comparativamente com estudo supracitado. Tal como no estudo de *Hartmann et al* (2003), no presente estudo a escolha de um *cut-off* mais baixo aumenta a especificidade do parâmetro, contudo a sensibilidade do mesmo diminui [65].

No presente estudo, o VPP para o *cut-off* ideal do rácio A/G foi 0,82 e o VPN foi de um. Estes resultados corroboram o estudo de *Hartmann et al* (2003) e *Jeffery et al* (2012), permitindo reforçar o facto de o rácio A/G ser mais útil para diminuir a suspeita de um resultado positivo no diagnóstico molécula em gatos clinicamente suspeitos, na medida em que apresentam VPN mais elevados do que os VPP [65] [97].

Relativamente ao Δ TCN, *Giordano et al* (2015) demonstraram que este parâmetro, definido como o rácio entre as contagens celulares obtidas nos canais WBC/DIFF e WBC/BASO do analisador hematológico *Sysmex XT-2000iV*[®], é mais elevado em efusões de gatos afetados com PIF do que em gatos com efusões de outras etiologias [67]. Tal pode ser explicado pelo facto do canal WBC/BASO utilizar um reagente ácido. Nas efusões típicas da PIF, devido ao alto teor proteico, fibrinogénio e mediadores inflamatórios, este reagente induz a formação de coágulos que prendem as células e resultam numa contagem falsamente baixa no canal WBC/BASO. Por conseguinte, este mecanismo, responsável pelo aumento do Δ TCN, é muito semelhante ao princípio analítico do teste da Rivalta [67].

Em contraste com o teste de Rivalta, a determinação do Δ TCN é um método automatizado, o que faz com que erros analíticos sejam menos prováveis de acontecer, mais padronizado em termos de reagentes e é uma análise quantitativa. Uma única medição permite recolher outras informações, nomeadamente sobre os tipos de células e a CTCN presentes nas efusões ^[66].

No presente estudo, o Δ TCN foi usado para avaliar a presença de proteínas precipitadas e mediadores inflamatórios, nas efusões dos gatos com suspeita clínica de PIF. Verificou-se que, o Δ TCN foi maior em gatos com PIF (mediana de 8,10) do que em gatos com RT-PCR negativo (mediana de 1,30). Estes resultados estão de acordo com o estudo de *Giordano et al* (2015) supracitado, o qual demonstrou que os gatos com PIF tinham valores de Δ TCN significativamente superiores (mediana de 9,3) comparativamente aos gatos sem a doença (mediana de um) ^[67].

Ainda segundo o estudo de *Giordano et al* (2015), o *cut-off* ideal que otimizou o poder discriminatório do Δ TCN foi de valor superior a 1,7. Para este valor, a sensibilidade e especificidade foram de 90% e 93%, respetivamente. Valores de Δ TCN superiores a 2,5 foram referidos como muito sugestivos da doença, pois apresentam 100% de especificidade. Os mesmos autores referiram ainda que, um Δ TCN superior a 3,4 era diagnóstico de PIF ^[67].

Comparando o *cut-off* ideal descrito por *Giordano et al* (2015) com o determinado no presente estudo, verifica-se que neste estudo o *cut-off* ideal foi de valor superior a 4,9, tendo sido significativamente mais elevado do que o descrito na bibliografia ^[68]. Por um lado, a especificidade associada a este valor mostrou ser igualmente elevada (92,8%). Por outro lado, a sua sensibilidade revelou ser mais baixa (70,37%). Neste estudo, cerca de 70% das efusões com PIF tinha Δ TCN superior a 4,9, sendo que os restantes 30% corresponderam a efusões com Δ TCN inferior ou igual a 4,9.

Apesar da diferença nos valores de *cut-off* em ambos os estudos, os resultados do presente estudo revelaram que, o Δ TCN foi estatisticamente significativo na discriminação de PIF na população analisada, demonstrado pelo valor de *P* menor que 0,001 e a AUC igual a 0,811. Estes resultados corroboram o descrito anteriormente por *Giordano et al* (2015), os quais apresentaram um valor de *P* menor que 0,001 e AUC igual a 0,94 para este parâmetro ^[67].

De acordo com a bibliografia, variáveis com um PPV muito alto são mais importantes porque preveem a probabilidade dos animais realmente ter a doença, e é isso que o clínico precisa de saber ^[65]. O presente estudo revelou um VPP elevado associado ao Δ TCN (0,95), o que significa que sempre que este parâmetro é superior a 4,9 é muito mais provável animal ter RT-PCR positivo do que RT-PCR negativo.

No presente estudo, a determinação do Δ TCN usando o analisador hematológico *Sysmex XT-2000iV*[®] mostrou especificidade e VPP superiores às anteriormente reportadas para o teste da Rivalta ^[66]. O teste da Rivalta é rápido, barato e preciso, mas pode ser limitado devido a alguns fatores pré-analíticos ou analíticos, como a realização inadequada do teste ou utilização de reagentes impróprios.

Adicionalmente, o teste da Rivalta fornece resultados semi-quantitativos (negativos, positivos ou duvidosos) e não permite classificar a gravidade da alteração. Por último, a avaliação do teste é subjetiva e não existe atualmente informação sobre a variabilidade inter-observador [66].

Este estudo apresentou algumas limitações. Primeiramente, dever-se-á ter em conta o reduzido número de animais da amostra. Sendo um estudo sobretudo de carácter retrospectivo, baseado nos casos clínicos recebidos no L.V. INNO ao longo de quatro anos, não foi possível acompanhar todos procedimentos durante o período de estágio curricular. Mais, sabendo que todos os casos foram investigados através da base de dados do sistema informático, a sua aquisição dependeu das informações transmitidas pelos médicos veterinários dos respetivos Centros de Atendimento Médico-Veterinário ao L.V. INNO. Uma vez que a maioria das amostras não tinha informações sobre a anamnese, os sinais clínicos, resultados de exames de diagnóstico complementares (p. ex., hematologia, bioquímica) e diagnóstico definitivo, essas informações não constam no presente estudo. Estes critérios são considerados importantes de forma a obter uma caracterização completa e fidedigna dos casos da amostra. Esta falta de dados traduziu-se na falta de resposta acerca da etiologia subjacente ao desenvolvimento das efusões negativas no RT-PCR (85,7% dos casos).

Outra limitação importante é a falta de um diagnóstico definitivo da doença. No presente estudo foi utilizada uma população de gatos com suspeita clínica de PIF, sendo a infeção confirmada por RT-PCR em tempo real do vírus mutado. O facto deste teste identificar apenas duas mutações (M1058L e L1060A), faz com que alguns falsos negativos possam ter ocorrido por impossibilidade de identificar outras mutações. Esta situação pode explicar as diferenças nos resultados do presente estudo em relação ao descrito na bibliografia supracitada. No estudo de *Giordano et al* (2015), a doença foi confirmada pela combinação de necrópsia, histopatologia e imunohistoquímica [67]. No estudo de *Hartmann et al* (2003) a PIF foi confirmada por histopatologia. Estes são considerados os testes *gold standard* do diagnóstico [65].

6. Conclusão

As conclusões retiradas com a elaboração deste estudo são essencialmente de ordem prática, tendo em conta as limitações enunciadas anteriormente, nomeadamente o tamanho reduzido da amostra e a falta de dados no que respeita a anamnese, sinais clínicos, exames de diagnóstico complementares e diagnóstico definitivo da doença. O ideal seria ter uma amostragem maior e mais significativa. O preenchimento correto, assertivo e completo das fichas de requisição das análises no que toca à informação clínica dos pacientes é fundamental para direcionar o diagnóstico e estudos futuros.

O diagnóstico *ante-mortem* da PIF continua a ser um desafio devido à apresentação clínica e laboratorial variáveis e inespecíficas da doença. Atualmente as técnicas de diagnóstico consideradas o *gold standard* são invasivas e dispendiosas. Porém, as efusões cavitárias quando presentes, facilitam o diagnóstico. No presente estudo, a análise bioquímica e celular das efusões, embora não completamente específica para a PIF, mostrou ser útil para apoiar a suspeita clínica da doença na medida em que, as efusões com PIF apresentavam conteúdo proteico elevado (mediana 5,27), rácio A/G baixo (mediana 0,54) Δ TCN elevado (mediana 8,10) e CTCN elevada (mediana 3594), sendo estes dados compatíveis com o que se verifica na literatura. Mais, e em concordância com a bibliografia, o transudado modificado foi, neste estudo, o tipo de efusão com PIF mais comum.

O rácio A/G (inferior ou igual a 0,88) e o Δ TCN (superior a 4,9) determinados nas efusões, mostram ter importância na discriminação de gatos com PIF, na população clinicamente suspeita. O rácio A/G mostrou ser excelente para diminuir a suspeita do resultado positivo do diagnóstico molecular, porque apresentou sensibilidade de 100% e VPN de um, validando a bibliografia. Já o Δ TCN mostrou ser mais importante para confirmar a presença da infeção do para excluí-la, por ter especificidade e VPP elevados, de 92,7% e 0,95 respetivamente. Contudo, o resultado destes parâmetros deve ser sempre interpretado de forma cuidadosa e tendo em conta todos os dados disponíveis, continuando a histopatologia, associada a imunohistoquímica, a ser o método de diagnóstico de PIF com maior valor.

Por fim, o presente estudo permitiu, de uma forma muito geral, caracterizar a população de felinos afetados por esta doença. Assim, concluiu-se que na população inicialmente suspeita de PIF, os gatos com RT-PCR positivo apresentaram maioritariamente idades inferiores ou iguais a dois anos (81%), sendo na sua maioria machos (52%) e animais de raça (89%).

Em suma, os dados obtidos validam, na sua maioria, a bibliografia, existindo algumas temáticas que poderiam beneficiar de uma investigação mais profunda, de forma a concluir se as diferenças encontradas são resultado dessas limitações, ou se, pelo contrário, demonstram efetivamente conclusões díspares.

7. Bibliografia

- [1] Thrall M.A. (2012). *Veterinary Hematology and Clinical Chemistry* (2^oed), Wiley-Blackwell, Ames, Iowa, ISBN 978-0-8138-1027-0, pp.762
- [2] Tothova C., Nagy O. & Kovac G. (2016). Serum proteins and their diagnostic utility in Veterinary medicine: a review. In *Veterinary Medicine*, 61: 475-496. Doi: 10.17221/19/2016-VETMED.
- [3] Harvey J. W. (2012). *Veterinary hematology: a diagnostic guide and color atlas*, Elsevier/Saunders, St. Louis, USA, ISBN 978-1-4377-0173-9, pp. 360.
- [4] Lilliehöök I. & Tvedten H. (2009). Validation of the Sysmex XT-2000iV hematology system for dogs, cats, and horses. I. Erythrocytes, platelets, and total leukocyte counts. In *Veterinary Clinical Pathology*, 38(2):163-74. Doi: 10.1111/j.1939-165X.2009.00125.x.
- [5] Lilliehöök I. & Tvedten H. (2009). Validation of the Sysmex XT-2000iV hematology system for dogs, cats, and horses. II. Differential leukocyte counts. In *Veterinary Clinical Pathology*. Doi: 10.1111/j.1939-165X.2009.00126.x.
- [6] Elliott J., Grauer G.F. & Westropp J.L. (2017). *Manual of canine and feline nephrology and urology* (3^oed), *British Small Animal Veterinary Association* (BSAVA), Quedgeley, England, 978-1-905319-94-7, pp. 360.
- [7] Callens J. & Bartges W. (2015). Urinalysis. In *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 45(4):621-37. Doi: 10.1016/j.cvsm.2015.02.001.
- [8] Yadav N., Ahmed N., Nath J., Mahanta D. & Kalita K. (2020). Urinalysis in dog and cat: a review. In *Veterinary World*, 13(10):2133-2141. Doi: 10.14202/vetworld.2020.2133-2141.
- [9] Miller W.H., Griffin C.E., Campbell K.L., Muller G.H. & Scott D.W. (2013). *Muller & Kirk's Small Animal Dermatology* (7^oed), Elsevier, St. Louis, USA, ISBN 978-1-4160-0028-0, pp. 938.
- [10] Markey B.K. (2013). *Clinical Veterinary Microbiology* (2^oed), Elsevier, Edinburgh, ISBN 978-0-7234-3237-1, pp.901.
- [11] ESCCAP (2018). Control of intestinal protozoa in dogs and cats. Obtido a julho de 2021, de ESCCAP: http://www.esccap.org/uploads/docs/xnqpgri2_0701_ESCCAP_Guideline_GL6_v7_1p.pdf.
- [12] Zajac A. & Conboy G. A. (2012). *Veterinary Clinical Parasitology* (8^oed), Wiley-Blackwell, Chichester, West Sussex, ISBN 978-0-8138-2053-8, pp. 354.
- [13] Alves J. & Santos A. (2016). Prevalence of *Giardia* spp. in young dogs using a combination of two diagnostic methods. In *Acta Parasitológica*, 61(2):261-266. Doi: 10.1515/ap-2016-0036.

- [14] Uchôa M., Sudré A.P., Macieira B. & Almosny P. (2017). The influence of serial fecal sampling on the diagnosis of giardiasis in humans, dogs, and cats. In *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*. Doi: 10.1590/s1678-9946201759061.
- [15] Callahan G.N. & Yates R.M. (2014). *Basic Veterinary Immunology*, University Press of Colorado, Boulder, EUA, pp. 337.
- [16] Tizard I.R. (2014). *Imunologia Veterinária*, Elsevier, Rio de Janeiro, ISBN 978-85-352-7966-5, pp. 1217.
- [17] Maurelli MP, Bosco A, Foglia Manzillo V, Vitale F, Giaquinto D, Ciuca L, Molinaro G, Cringoli G, Oliva G, Rinaldi L & Gizzarelli M. (2020). Clinical, Molecular and Serological Diagnosis of Canine Leishmaniosis: An Integrated Approach. In *Veterinary Sciences*, 7(2):43. Doi: 10.3390/vetsci7020043.
- [18] Peterson M. (2012) Hyperthyroidism in Cats: What's causing this epidemic of thyroid disease and can we prevent it?. In *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 14(11):804–818. Doi: 10.1177/1098612X12464462.
- [19] Feldman E.C, Nelson R.W, Reusch C. & Scott-Moncrieff J.C.R. (2015). *Canine & feline endocrinology* (4thed), Elsevier Saunders, St. Louis, Missouri, ISBN 978-1-4557-4456-5, pp.669.
- [20] Dempsey S. M. & Ewing P. J. (2011). A Review of the Pathophysiology, Classification, and Analysis of Canine and Feline Cavitory Effusions. In *Journal of the American Animal Hospital Association*, 47(1):1-11. Doi: 10.5326/JAAHA-MS-5558.
- [21] Jaimes J. A. & Whittaker G. R. (2018). Feline coronavirus: Insights into viral pathogenesis based on the spike protein structure and function. In *Virology*, 517:108–121. Doi: 10.1016/j.virol.2017.12.027.
- [22] Tekes G. & Thiel H. J. (2016). Feline Coronaviruses. In *Advances in Virus Research*, 96:193–218. Doi: 10.1016/bs.aivir.2016.08.002.
- [23] Haake C., Cook S., Pusterla N. & Murphy B. (2020). Coronavirus Infections in Companion Animals: Virology, Epidemiology, Clinical and Pathologic Features. In *Viruses*, 12(9):1023. Doi: 10.3390/v12091023.
- [24] Jaimes J. A., Millet J. K., Stout A. E., André N. M., & Whittaker G. R. (2020). A Tale of Two Viruses: The Distinct Spike Glycoproteins of Feline Coronaviruses. In *Viruses*, 12(1):83. Doi: 10.3390/v12010083.
- [25] Kipar A. & Meli M. L. (2014) Feline Infectious Peritonitis: Still an Enigma?. In *Veterinary Pathology*, 51(2):505–526, Mar. Doi: 10.1177/0300985814522077.
- [26] Addie D.D., McDonald M., Audhuy S., Burr P., Hollins J., Kovacic R., Lutz H., Luxton Z., Mazar S. & Meli M.L. (2012). Quarantine protects Falkland Islands (Malvinas) cats from feline coronavirus infection. In *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 14 (2):171–176. Doi: 10.1177/1098612X11429644.

- [27] Felten S., Klein-Richers U., Hofmann-Lehmann R., Bergmann M., Unterer S., Leutenegger C.M. & Hartmann K. (2020). Correlation of Feline Coronavirus Shedding in Feces with Coronavirus Antibody Titer. In *Pathogens*, (9)8:598. Doi: 10.3390/pathogens9080598.
- [28] An D.J., Jeoung H.Y., Jeong W., Park J.Y., Lee M.H., & Park B.K. (2011) Prevalence of Korean cats with natural feline coronavirus infections. In *Virology Journal*, 8(1):455. Doi: 10.1186/1743-422X-8-455.
- [29] Wang Y.T., Chueh L.L. & Wan C.H. (2014). An eight-year epidemiologic study based on baculovirus-expressed type-specific spike proteins for the differentiation of type I and II feline coronavirus infections. In *BMC Veterinary Research*, 10(1):186. Doi: 10.1186/s12917-014-0186-7.
- [30] Taharaguchi S., Soma T. & Hara M. (2012). Prevalence of Feline Coronavirus Antibodies in Japanese Domestic Cats during the Past Decade. In *Journal Veterinary Medical Science*, 74(10):1355–1358. Doi: 10.1292/jvms.11-0577.
- [31] Duarte A., Veiga I. & Tavares L. (2009) Genetic diversity and phylogenetic analysis of Feline Coronavirus sequences from Portugal. In *Veterinary Microbiology*, 138 (1–2):163–168. Doi: 10.1016/j.vetmic.2009.03.009.
- [32] Riemer F., Kuehner K. A., Ritz S., Sauter-Louis C. & Hartmann K. (2016). Clinical and laboratory features of cats with feline infectious peritonitis – a retrospective study of 231 confirmed cases (2000–2010). In *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 18(4):348–356. Doi: 10.1177/1098612X15586209.
- [33] Pedersen N. C., Allen C. E. & Lyons L. A. (2008). Pathogenesis of feline enteric coronavirus infection. In *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 10 (6): 529–541. Doi: 10.1016/j.jfms.2008.02.006.
- [34] Drechsler Y., Alcaraz A., Bossong F. J., Collisson E. W. & Diniz P.P. (2011). Feline Coronavirus in Multicat Environments. In *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 41(6):1133–1169. Doi: 10.1016/j.cvsm.2011.08.004.
- [35] Kennedy M. A. (2020). Feline Infectious Peritonitis. In *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 50(5):1001–1011. Doi: 10.1016/j.cvsm.2020.05.002.
- [36] Aydin H. & Yildirim S. (2019) Investigation of the relation between feline infectious peritonitis and retroviruses in cats. In *GSC Biological and Pharmaceutical Sciences*, 6(2):071–078. Doi: 10.30574/gscbps.2019.6.2.0011.
- [37] Worthing K.A., Wigney D.I., Dhand N.K., Fawcett A., McDonagh P., Malik R. & Norris J.M. (2012). Risk factors for feline infectious peritonitis in Australian cats. In *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 14(6):405–412. Doi: 10.1177/1098612X12441875.

- [38] Addie D.D. (2012). Feline Coronavirus Infection. In *Infectious diseases of the dog and cat* (4thed), ed. Greene C.E., Elsevier/Saunders, St. Louis, Missouri, ISBN 978-1-4160-6130-4, pp.92-108.
- [39] André N. M., Miller A. D. & Whittaker G. R. (2020) Feline infectious peritonitis virus-associated rhinitis in a cat. In *Journal of Feline Medicine and Surgery Open Reports*. 6(1) p. 205511692093058. Doi: 10.1177/2055116920930582.
- [40] Addie D.D. (2020). Feline Coronavirus and Feline Infectious Peritonitis Diagnosis and Prevention. Biogal Laboratories. Obtido a julho de 2021, de: <https://www.biogal.com/wp-content/uploads/2020/06/Addie-FCoV-FIP-diagnosis-prevention-2020.pdf>.
- [41] Pedersen N. C. (2014). An update on feline infectious peritonitis: Virology and immunopathogenesis. In *The Veterinary Journal*, 201(2):123–132. Doi: 10.1016/j.tvjl.2014.04.017.
- [42] Kipar A., Meli M. L., Baptiste K. E., Bowker L. J. & Lutz H. (2010) Sites of feline coronavirus persistence in healthy cats. In *Journal of General Virology*, 91(7):1698–1707. Doi: 10.1099/vir.0.020214-0.
- [43] Vogel, L., Van der Lubben, M., te Lintelo, E. G., Bekker, C. P., Geerts, T., Schuijff, L. S., Grinwis, G. C., Egberink, H. F. & Rottier, P. J. (2010). Pathogenic characteristics of persistent feline enteric coronavirus infection in cats. In *Veterinary Research*, 41(5):71. Doi: 10.1051/vetres/2010043.
- [44] Myrrha, L. W., Silva, F. M., Peternelli, E. F., Junior, A. S., Resende, M., & de Almeida, M. R. (2011). The paradox of feline coronavirus pathogenesis: a review. In *Advances in virology*, 2011:109849. doi: 10.1155/2011/109849.
- [45] Porter, E., Tasker, S., Day, M.J. *et al.* (2014) Amino acid changes in the spike protein of feline coronavirus correlate with systemic spread of virus from the intestine and not with feline infectious peritonitis. In *Veterinary Research*, 45: 49. Doi:10.1186/1297-9716-45-49.
- [46] Chang H.W., 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. In *Journal of General Virology*, 91(2):415–420. Doi: 10.1099/vir.0.016485-0.
- [47] Licitra B.N., Millet J.K., Regan A.D., Hamilton B.S., Rinaldi V.D., Duhamel G.E., Whittaker G.R. (2013). Mutation in Spike Protein Cleavage Site and Pathogenesis of Feline Coronavirus. In *Emergence Infected Diseases*, 19(7):1066–1073. Doi: 10.3201/eid1907.121094.
- [48] Pedersen N.C., Liu H., Scarlett J., Leutenegger C.M., Golovko L., Kennedy H., Kamal F.M. (2012). Feline infectious peritonitis: Role of the feline coronavirus 3c gene in intestinal tropism and pathogenicity based upon isolates from resident and adopted shelter cats. In *Virus Research*, 165(1):17–28. Doi: 10.1016/j.virusres.2011.12.020.

- [49] Brown M. A., Troyer J. L., Pecon-Slattey J., Roelke M. E. & O'Brien S. J. (2009) Genetics and Pathogenesis of Feline Infectious Peritonitis Virus. In *Emergence Infectious Diseases*, 15(9):1445–1452. Doi: 10.3201/eid1509.081573.
- [50] Battilani M., Coradin T., Scagliarini A., Ciulli S., Ostanello F., Prospero S. & Morganti L. (2003) Quasispecies composition and phylogenetic analysis of feline coronaviruses (FCoVs) in naturally infected cats. In *FEMS Immunol Med Microbiol*, 39(2):141–147. Doi: 10.1016/S0928-8244(03)00237-2.
- [51] Barker E. & Tasker S. (2020). Update on feline infectious peritonitis. In *Clinical practice*, 42(7): 372–383. Doi: 10.1136/inp.m3187.
- [52] Masters P. S. (2006). The Molecular Biology of Coronaviruses. In *Advances in Virus Research*, 661:93–292, Elsevier. Doi: 10.1016/S0065-3527(06)66005-3.
- [53] Pearson M., LaVoy A., Evans S., Vilander A., Webb C., Graham B., Musselman E., LeCureux J., VandeWoude S., Dean G.A. (2019) Mucosal Immune Response to Feline Enteric Coronavirus Infection. In *Viruses*, 11(10):906. Doi: 10.3390/v11100906.
- [54] Mustaffa-Kamal F., Liu H., Pedersen N. C. & Sparger E. E. (2019) Characterization of antiviral T cell responses during primary and secondary challenge of laboratory cats with feline infectious peritonitis virus (FIPV). In *BMC Veterinary Research*, 15(1):165, doi: 10.1186/s12917-019-1909-6.
- [55] Takano T., Azuma N., Satoh M., Toda A., Hashida Y., Satoh R., Hohdatsu T. (2009) Neutrophil survival factors (TNF-alpha, GM-CSF, and G-CSF) produced by macrophages in cats infected with feline infectious peritonitis virus contribute to the pathogenesis of granulomatous lesions. In *Arch Virology*, 154(5): 775–781. Doi: 10.1007/s00705-009-0371-3.
- [56] Giordano A. & Paltrinieri S. (2009) Interferon- γ in the serum and effusions of cats with feline coronavirus infection. In *The Veterinary Journal*, 180(3):396–398. Doi: 10.1016/j.tvjl.2008.02.028.
- [57] Pedersen N. C. (2009). A review of feline infectious peritonitis virus infection: 1963–2008. In *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 11(4):225–258. Doi: 10.1016/j.jfms.2008.09.008.
- [58] Tasker S. (2018). Diagnosis of feline infectious peritonitis: Update on evidence supporting available tests. In *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 20(3):228–243. Doi: 10.1177/1098612X18758592..
- [59] Barker & Tasker. (2019). Feline infectious peritonitis: how can we get a diagnosis?. Obtido a setembro de 2021, de: <https://www.langfordvets.co.uk/small-animal-referral-hospital/recent-articles/>
- [60] Doenges S.J., Weber K., Dorsch R., Fux R., Fischer A., Matiasek L.A., Matiasek K. & Hartmann K. (2016). Detection of feline coronavirus in cerebrospinal fluid for diagnosis of feline

infectious peritonitis in cats with and without neurological signs. In *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 18(2):104–109. Doi: 10.1177/1098612X15574757.

[61] Addie D.D. (2018). Feline Infectious Peritonitis (FIP) treatment. *Catvirus*. Obtido a julho de 2021, de: https://d12geb6i3t2qyg.cloudfront.net/webinar_resources/1dbad80d-49af-4791-aab1-1291fd693745.pdf.

[62] Takano T., Hohdatsu T., Hashida Y., Kaneko Y., Tanabe M., e Koyama H. (2007) A “possible” involvement of TNF-alpha in apoptosis induction in peripheral blood lymphocytes of cats with feline infectious peritonitis. In *Veterinary Microbiology*, 119(2–4):121–131. Doi: 10.1016/j.vetmic.2006.08.033.

[63] Moyadee W., Jaroensong T. & Roytrakul S. (2019) Characteristic clinical signs and blood parameters in cats with Feline Infectious Peritonitis. In *Agriculture and Natural Resources*, 53(4):433-438. Doi: 10.34044/j.anres.2019.53.4.15.

[64] Stranieri A., Giordano A., Bo S., Braghiroli C. & Paltrinieri S., (2017). Frequency of electrophoretic changes consistent with feline infectious peritonitis in two different time periods (2004–2009 vs 2013–2014). In *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 19(8): 880–887. Doi: 10.1177/1098612X16664389.

[65] 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. In *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 17(6): 781–790. Doi: 10.1111/j.1939-1676.2003.tb02515.x.

[66] Fischer Y., Sauter-Louis C. & Hartmann K. (2012) Diagnostic accuracy of the Rivalta test for feline infectious peritonitis. In *Veterinary Clinic Pathology*, 41(4): 558–567. Doi: 10.1111/j.1939-165X.2012.00464.x.

[67] Giordano A., Stranieri A., Rossi G. & Paltrinieri S. (2015) High diagnostic accuracy of the Sysmex XT-2000iV delta total nucleated cells on effusions for feline infectious peritonitis. In *Veterinary Clinical Pathology*, 44(2):295–302. Doi: 10.1111/vcp.12241.

[68] Felten S. & Hartmann K. (2019) Diagnosis of Feline Infectious Peritonitis: A Review of the Current Literature. In *Viruses*, 11(11): 1068. Doi: 10.3390/v11111068.

[69] Sharif S., Arshad S. S., Hair-Bejo M., Omar A. R., Zeenathul N. A. & Alazawy A. (2010) Diagnostic Methods for Feline Coronavirus: A Review. In *Veterinary Medicine International*, vol., pp. 1–7. Doi: 10.4061/2010/809480.

[70] Lewis K. M. & O'Brien R. T. (2010). Abdominal Ultrasonographic Findings Associated With Feline Infectious Peritonitis: A Retrospective Review of 16 Cases. In *Journal of the American Animal Hospital Association*, 46(3):152–160. Doi: 10.5326/0460152.

[71] Crawford A.H., Stoll A.L., Sanchez-Masian D., Shea A., Michaels J., Fraser A.R. & Beltran E. (2017) Clinicopathologic Features and Magnetic Resonance Imaging Findings in 24 Cats With

Histopathologically Confirmed Neurologic Feline Infectious Peritonitis. In *Journal Veterinary Internal Medicine*, 31(5):1477–1486. Doi: 10.1111/jvim.14791.

[72] Addie D.D., le Poder S., Burr P., Decaro N., Graham E., Hofmann-Lehmann R., Jarrett O., McDonald M., Meli M.L. (2015) Utility of feline coronavirus antibody tests. In *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 17(2):152–162. Doi: 10.1177/1098612X14538873.

[73] 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. In *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 230(2):199–205. Doi: 10.2460/javma.230.2.199.

[74] Dunbar D., Kwok W., Graham E., Armitage A., Irvine R., Johnston P., McDonald M., Montgomery D., Nicolson L., Robertson E., Weir W., Addie D.D. (2019). Diagnosis of non-effusive feline infectious peritonitis by reverse transcriptase quantitative PCR from mesenteric lymph node fine-needle aspirates. In *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 21(10): 910–921. Doi: 10.1177/1098612X18809165.

[75] Barker E.N., Stranieri A., Helps C.R. et al. (2017). Limitations of using feline coronavirus spike protein gene mutations to diagnose feline infectious peritonitis. In *Veterinary Research*, 48(1):60. Doi: 10.1186/s13567-017-0467-9.

[76] Izes A. M., Yu J., Norris J. M. & Govendir M. (2020). Current status on treatment options for feline infectious peritonitis and SARS-CoV-2 positive cats. In *Veterinary Quarterly*, 40(1): 322–330. Doi: 10.1080/01652176.2020.1845917.

[77] Updates in FIP. (2007). Pathogenesis, Diagnosis and Treatment. Obtido a julho de 2021, de VIN: <https://www.vin.com/apputil/content/defaultadv1.aspx?id=3860779&pid=11242>.

[78] Hugo, T. B., & Heading, K. L. (2015). Prolonged survival of a cat diagnosed with feline infectious peritonitis by immunohistochemistry. In *The Canadian Veterinary Journal = La revue veterinaire canadienne*, 56(1), 53–58.

[79] Legendre A. M., Kuritz T., Galyon G., Baylor V. M. & Heidel R. E. (2017) Polyprenyl Immunostimulant Treatment of Cats with Presumptive Non-Effusive Feline Infectious Peritonitis In a Field Study. In *Frontiers in Veterinary Science*, vol 4. Doi: 10.3389/fvets.2017.00007.

[80] Hartmann K. (2005). Feline infectious peritonitis. In *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 35(1): 39–79. Doi: 10.1016/j.cvsm.2004.10.011.

[81] Pedersen N.C., Kim Y., Liu H., Galasiti Kankanamalage A.C., Eckstrand C., Groutas W.C., Bannasch M., Meadows J.M., Chang K.O (2018) Efficacy of a 3C-like protease inhibitor in treating various forms of acquired feline infectious peritonitis. In *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 20(4): 378–392. Doi: 10.1177/1098612X17729626.

[82] Pedersen N.C., Perron M., Bannasch M., Montgomery E., Murakami E., Liepnieks M., Liu H. (2019). Efficacy and safety of the nucleoside analog GS-441524 for treatment of cats with

naturally occurring feline infectious peritonitis. In *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 21(4): 271–281. Doi: 10.1177/1098612X19825701.

[83] Dickinson P.J., Bannasch M., Thomasy S.M., Murthy V.D., Vernau K.M., Liepnieks M., Montgomery E., Knickelbein K.E., Murphy B., Pedersen N.C. (2020). Antiviral treatment using the adenosine nucleoside analogue GS -441524 in cats with clinically diagnosed neurological feline infectious peritonitis. In *Journal Veterinary Internal Medicine*, 34(4):1587–1593. Doi: 10.1111/jvim.15780.

[84] Takano T., Akiyama M., Doki T. & Hohdatsu T. (2019). Antiviral activity of itraconazole against type I feline coronavirus infection. In *Veterinary Research*, 50(1):5. Doi: 10.1186/s13567-019-0625-3.

[85] Tanaka Y., Sato Y. & Sasaki T. (2017) Feline coronavirus replication is affected by both cyclophilin A and cyclophilin B. In *Journal of General Virology*, 98(2): 190–200. Doi: 10.1099/jgv.0.000663.

[86] Addie D.D. (2021). Feline Infectious Peritonitis (FIP) treatment. *Catvirus*. Obtido a setembro 2021, de: <http://www.catvirus.com/treatment.htm#Immuno>.

[87] Tizard I. R. (2020). Vaccination against coronaviruses in domestic animals. In *Vaccine*, 38(33): 5123–5130. Doi: 10.1016/j.vaccine.2020.06.026.

[88] Addie D.D., Belák S., Boucraut-Baralon C., Egberink H., Frymus T. et al. (2009). Feline Infectious Peritonitis: ABCD Guidelines on Prevention and Management. In *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 11(7): 594–604. Doi: 10.1016/j.jfms.2009.05.008.

[89] Klein-Richers U., Hartmann K., Hofmann-Lehmann R., Unterer S., Bergmann M., Rieger A., Leutenegger C., Pantchev N., Balzer J., Felten S. (2020). Prevalence of Feline Coronavirus Shedding in German Catteries and Associated Risk Factors. In *Viruses*, 12(9):1000. Doi: 10.3390/v12091000.

[90] Addie D. D., Curran S., Bellini F., Crowe B., Sheehan E., Ukrainchuk, L., & Decaro, N. (2020). Oral Mutian® stopped faecal feline coronavirus shedding by naturally infected cats. In *Research in Veterinary Science*. Doi:10.1016/j.rvsc.2020.02.012

[91] IDEXX. (2016). FIP Virus RealPCR™ Test Validation Studies. Obtido a agosto de 2021, de: <https://www.idexx.com/files/fip-virus-realpcr-validation-studies-white-paper.pdf>.

[92] Mercaldo N.D., Lau K.F., Zhou X.H. (2007). Confidence intervals for predictive values with an emphasis to case-control studies. In *Statistics in Medicine*, 26(10):2170–83. Doi: 10.1002/sim.2677. PMID: 16927452.

[93] Toribio J.-A. L. M., Norris J. M., White J. D., Dhand N. K., Hamilton S. A. & Malik R. (2009) Demographics and husbandry of pet cats living in Sydney, Australia: Results of cross-sectional survey of pet ownership. In *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 11(6): 449–461. Doi: 10.1016/j.jfms.2008.06.010.

- [94] Yin Y., Li T., Wang C., Liu X., Ouyang H., Ji W., Liu J., Liao X., Li J., Hu C. (2021). A retrospective study of clinical and laboratory features and treatment on cats highly suspected of feline infectious peritonitis in Wuhan, China. In *Scientific Reports*, 11(1):5208. Doi: 10.1038/s41598-021-84754-0.
- [95] Sykes J. (2013). Feline coronavirus infection. In *Canine and Feline Infectious Diseases*, ed. Sykes J., Elsevier Inc., Missouri, ISBN 9781437707953, pp. 195-208.
- [96] Thrall M. A. (2020). Abdominal and Thoracic Fluid Analysis in Dogs and Cats. In *Veterinary Cytology*, ed. Sharkey L. C., Radin M. J., & Seelig D., Wiley, ISBN 9781119380559, pp. 695–712.
- [97] Jeffery U., Deitz K. & Hostetter S. (2012). Positive predictive value of albumin: globulin ratio for feline infectious peritonitis in a mid-western referral hospital population. In *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 14(12):903–905. Doi: 10.1177/1098612X12454862.