

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**Estudo Clínico, Laboratorial e Epidemiológico
da Imunodeficiência Viral Felina (FIV)
no Município de São Luís – MA**

Nathália dos Santos Martins

São Luís – MA
2014

NATHÁLYA DOS SANTOS MARTINS

**Estudo Clínico, Laboratorial e Epidemiológico
da Imunodeficiência Viral Felina (FIV)
no Município de São Luís – MA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação da Universidade Estadual do Maranhão, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Área de Concentração: Medicina Veterinária Preventiva

Orientador: Prof. Dr. Ferdinan Almeida Melo

São Luís – MA

2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL

Dissertação de Mestrado aprovada em **17 de fevereiro de 2014** pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Jenner Karlisson Pimenta dos Reis
1º Membro

Prof^a. Dr^a. Ana Lúcia Abreu Silva
2º Membro

Prof. Dr. Ferdinan Almeida Melo
Orientador

São Luís – MA
2014

"Não quero ter a terrível limitação de quem vive apenas do que é passível de fazer sentido. Eu não: quero uma verdade inventada".

(Clarice Lispector)

À Deus, pelo dom da vida, por me dar a oportunidade de formar uma família e amá-la imensamente, forças para nunca desistir da minha vida profissional, mesmo nos momentos difíceis, que não foram poucos, e, por sempre ouvir minhas orações.

Aos meus pais Jonas Costa Martins (*In memoriam*) e Rosilene dos Santos Martins, por sempre se preocuparem com a minha educação e estudos. Meu pai que se dedicou inteiramente para que eu pudesse estudar numa boa escola e que meses antes da sua ida ao encontro com o Nosso Senhor, falou que já estaria com a consciência tranquila para partir, pois eu tinha sido aprovada para o curso de Medicina Veterinária. Minha mãe, abdicando um ano da sua vida para ajudar na criação do meu filho e, sobretudo, para que pudesse continuar o curso sem dificuldades, me ajudando nos momentos que preciso.

Ao meu marido Rudson Almeida de Oliveira e meu filho Christiano Yuri Martins de Oliveira, por tornarem minha caminhada mais tranquila, cheia de paz e com muito amor. São os responsáveis por eu ser essa pessoa hoje, eles me trazem, calma quando preciso, aconchego nos momentos difíceis e sempre me recebem de braços abertos, com um sorriso no rosto, quando preciso me ausentar do laço familiar para me dedicar aos estudos.

AGRADECIMENTOS

Ao meu Orientador Ferdinan Almeida Melo pela orientação ao longo desses anos, acreditando e confiando que eu pudesse concretizar o trabalho e realizar esse sonho. O que dizer dessa pessoa extremamente serena, que veio me ajudar nos momentos em que mais precisei e aceitou me orientar na iniciação científica, monografia e mestrado. Obrigada pelos ensinamentos, conselhos e por contribuir para mais um passo importante na minha vida profissional.

Ao Professor Jenner Karlisson Pimenta dos Reis que me recebeu no Retrolab (UFMG) de braços abertos e sem restrições. O meu imenso agradecimento por me proporcionar aprendizado das técnicas de biologia molecular, pelos ensinamentos, artigos enviados e ter me inserido na rotina do laboratório com confiança, acreditando que pudesse fluir na pesquisa.

Ao professor Rudson Almeida de Oliveira que me ensinou com muita cautela os princípios da estatística e por ter me guiado ao longo dessa jornada me ensinando como aplicar à pesquisa o conhecimento adquirido. Obrigada pelas longas tardes de paciência para elaboração de toda a estatística do trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal pelos ensinamentos transmitidos e pelas dúvidas sanadas, em especial, às professoras Ana Lúcia Abreu Silva e Alana Lislea de Sousa, as quais dedicam seu tempo em prol da melhoria do Curso de Mestrado estando sempre dispostas a ajudar.

À querida amiga Ana Paula Sousa Rodrigues, mestranda em Ciência Animal - UFMG, que dedicou parte do seu tempo para ensinar tudo que precisava saber para desenvolver o estudo. Sinceros agradecimentos a essa pessoa meiga, calma e que sempre diz: tudo vai dar certo, creia que Deus irá concretizar! Palavras são insuficientes para expressar o que sinto por ela. Deus coloca anjos em nossas vidas! Ela foi o anjo me acompanhou e me ajudou!

À Stefanne Aparecida Gonçalves, recebendo com muito carinho e atenção, ajudando-me no que precisava e sempre com muita simplicidade, sobretudo na ajuda para a realização do Elisa indireto.

À amiga Kellen Lisboa da Cruz por ter ajudado no Laboratório de Patologia Clínica (UEMA), me ensinando como realizar os exames hematológicos. Obrigada pela disposição em sempre ajudar. Somos mais que amigas irmãs de coração. Ao técnico do laboratório Carlos Alberto Alves Bezerra Júnior pela amizade e ensinamentos para realizar os exames bioquímicos.

Agradecimento especial à Luana Luz Reis, Luciana Luz Alves do Genbimol (UEMA) que ajudaram com paciência para delinear árvore filogenética e rede de haplótipos. Me inspiraram a querer mais e expandir o trabalho.

Às colegas da turma do Mestrado em Ciência Animal, Iara Oliveira dos Santos, Larissa Sarmiento dos Santos, Luana Luz Reis, Luciana Luz Alves, Glenda Mello Barros, Elizandra Sá dos Passos, Naia de Brito Alves, Aline Saldanha e Carolina Rocha, com as quais convivi durante dois anos, dividindo momentos agradáveis e troca de conhecimento. À Carla Janaina Rebouças Marques, aluna de iniciação científica, que ajudou numa fase do trabalho.

A UEMA pela formação profissional, ao Laboratório de Patologia Clínica pelo espaço disponível na realização dos exames, na pessoa da Médica Veterinária Silvia Helena. Ao Hospital Veterinário Universitário Francisco Edilberto Uchôa Lopes, pela colaboração em disponibilizar o acompanhamento clínico dos animais e possível coleta das amostras.

As clínicas particulares, pelas amostras coletadas.

Ao Retrolab – UFMG, por toda a equipe que colaborou na concretização da pesquisa.

Aos proprietários dos animais, que aceitaram as coletas do material para realização do projeto.

A CAPES pela concessão da bolsa.

Ao PROCAD/CAPES por proporcionar o intercâmbio com a UFMG, onde pude concluir toda a pesquisa.

A Fundação de Amparo à Pesquisa e Desenvolvimento Científico do Maranhão (FAPEMA), pelo financiamento da pesquisa.

A Coordenação do Mestrado em Ciência Animal, pela disponibilidade em sempre nos atender.

Estudo Clínico, Laboratorial e Epidemiológico da Imunodeficiência Viral Felina (FIV) no Município de São Luís – MA¹

Autora: Nathálya dos Santos Martins

Orientador: Prof. Dr. Ferdinan Almeida Melo

RESUMO

O vírus da Imunodeficiência viral felina (FIV) é um retrovírus de distribuição mundial, com prevalência entre 2,5% e 44%. A infecção causa imunossupressão, com declínio progressivo de Linfócitos T CD4⁺, gerando sinais clínicos secundários à infecções oportunistas. Objetivou-se avaliar aspectos clínicos, laboratoriais e epidemiológicos da imunodeficiência viral felina no município de São Luís – MA. Amostras de sangue total de 120 felinos foram testadas pela reação em cadeia da polimerase (PCR) com a finalidade de detectar o DNA proviral com amplificação de um fragmento de 244pb do gene *gag* do vírus da FIV, segundo Hohdatsu et al. (1993). Para detecção de anticorpos contra o vírus da FIV e antígeno p27 do FeLV, 150 amostras foram testadas com kit comercial de ensaio imunoenzimático rápido (ELISA - SNAP® Combo FeLV/FIV). Procedeu-se ainda, ELISA indireto, em 120 amostras, de acordo com Alves et al. (2013), utilizando-se antígeno r-p24 e conjugado peroxidase anti-felino IgG. Obteve-se 18,33% (22/120) de positividade para FIV considerando todos os testes utilizados. Nas técnicas de PCR e ELISA indireto encontrou-se valor igual a 10,83% (13/120) de animais positivos, enquanto que no SNAP combo plus observou-se 9,17% (11/120). Comparativamente, SNAP combo plus apresentou melhor sensibilidade, enquanto que ELISA indireto e PCR tiveram, similarmente, melhor especificidade ($p < 0,05$). A pequena diferença de especificidade entre os testes (todos acima de 90%) indica que os mesmos são bastante específicos e com VPN alto, podendo-se inferir que ambos tem capacidade de distinguir os verdadeiramente negativos. Foram observados sinais clínicos de alterações dermatológicas causadas por fungos, ácaros e bactérias, alterações oftálmicas, lesões da mucosa oral, alterações respiratórias, caquexia, desidratação, linfadenopatia, alterações genitourinárias e diarreia. A análise das variáveis hematimétricas e bioquímicas entre animais FIV positivos e negativos não demonstraram diferenças estatísticas significativas ($p > 0,05$). A análise filogenética revelou a presença do subtipo B em seis amostras analisadas, subtipo A numa amostra, e, duas amostras não agruparam com nenhum subtipo conhecido. Houve presença de cinco haplótipos (Hap-1, Hap-2, Hap-3, Hap-5 e Hap-6) exclusivos e um haplótipo compartilhado (Hap-4) sendo este o mais frequente. Desta forma conclui-se que vírus da FIV está presente na ilha de São Luís – MA e que a doença clínica existe no estado do Maranhão.

Palavras-chave: Vírus da imunodeficiência viral felina, Reação em cadeia da polimerase, ELISA, felinos.

¹ Dissertação de Mestrado em Ciência Animal – Medicina Veterinária Preventiva, Curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual do Maranhão, MA, 90f., fevereiro 2014.

Clinical, laboratorial and epidemiological studies of feline immunodeficiency virus infection in the city of Sao Luis, Maranhao state, Brazil. ¹

Author: Nathálya dos Santos Martins

Adviser: Prof. Dr. Ferdinan Almeida Melo

ABSTRACT

Feline Immunodeficiency (FIV) is caused by a retrovirus with worldwide distribution, and prevalence ranging from 2.5% to 44%. The FIV infection causes immunosuppression, with a progressive decline of CD4+ T lymphocytes, leading to clinical signs due to opportunistic infections. This work aimed to evaluate clinical, laboratorial and epidemiological aspects of the feline immunodeficiency virus infection in the city of São Luís, Maranhao state in Brazil. It was analyzed 120 samples of blood, by the polymerase chain reaction (PCR), to detect FIV proviral DNA. A fragment of 244pb of the gene *gag* of the FIV was obtained after amplification, Hohdatsu et al. (1993). For detection of antibodies against FIV and antigen p27 of FeLV, 150 samples were tested with commercial kit of rehearsal fast immunoenzymatic (ELISA - SNAP[®] Combo FeLV/FIV). An indirect ELISA for FIV detection that use recombinant p24 capsid protein was also used in 120 samples, according to Alves et al. (2013). It was obtained 18.33% (22/120) of FIV positive animals considering all tests used including Snap, ELISA and PCR. The PCR and indirect ELISA detected 10.83% (13/120) of positive animals, whereas SNAP[®] Combo FeLV/FIV showed 9.17% (11/120) of positivity. Comparatively, SNAP[®] Combo FeLV/FIV showed better sensitivity, while indirect ELISA and PCR in the similar way better specificity ($p < 0.05$). The small difference of specificity (all above 90%) among the tests indicates that all of them are very specific and with high VPN being able to detect the true negative animals. Dermatological clinical signs were observed due to fungus, mites and bacteria infections in FIV positive animals. Ophthalmic alterations, lesions of the oral cavity, breathing alterations, cachexy, dehydration, lymphadenopathy, alterations genitourinary and diarrhea also were reported. The analysis of the hematological and biochemistry variations among FIV positive and FIV negative animals didn't showed significant differences ($p > 0.05$). The phylogenetic analysis revealed the presence of the subtype B of FIV in six samples, subtype A in a sample, and, two samples not grouped with any known subtype. In addition five exclusive haplotypes were detected (Hap-1, Hap-2, Hap-3, Hap-5 and Hap-6) and a shared haplotype (Hap-4) being, the latter, more frequent. Taken together our results showed that FIV is present in the city of São Luís, Maranhao state with cats showing clinical signs suggestive of FIV infection.

Key Words: feline immunodeficiency virus, Polymerase Chain Reaction, ELISA, feline

SUMÁRIO

	Pág.
1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 Vírus e subtipos da Imunodeficiência viral felina	16
2.2 Epidemiologia e transmissão	18
2.3 Patogenia	20
2.4 Sinais clínicos.....	21
2.5 Diagnóstico	23
2.6 Tratamento	25
2.7 Profilaxia	27
2.8 Vírus e subtipos da leucemia felina	27
2.9 Epidemiologia e transmissão	30
2.10 Patogenia	32
2.11 Sinais clínicos	34
2.12 Diagnóstico	34
2.13 Tratamento	36
2.14 Profilaxia	36
3 OBJETIVOS	37
3.1 Geral	37
3.2 Específicos	37
4 MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1 Animais	38
4.2 Composição da amostra	38
4.3 Local	38
4.4 Autorização à pesquisa e ficha clínico-epidemiológica	39
4.5 Coleta de amostras	39
4.6 Processamento de amostras	39
4.6.1 Exame hematimétrico	39
4.6.2 Perfil bioquímico	40
4.6.3 Detecção de anticorpos contra o FIV e antígenos do FeLV	40
4.6.4 ELISA r-p24	41
4.6.5 Extração do DNA proviral	42
4.6.6 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	42
4.6.6.1 PCR para avaliação da eficiência das extrações	42
4.6.6.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR) para FIV	43
4.6.7 Eletroforese dos produtos da PCR	44
4.6.8 Sequenciamento de DNA	44
4.6.8.1 Purificação do DNA	44
4.6.8.2 Alinhamento das sequências	45
4.6.8.3 Análises filogenéticas e rede de haplótipos	45
4.7 Análise estatística	45
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
6 CONCLUSÕES	73
REFERÊNCIAS	74
APÊNDICE	90

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 01 – Distribuição percentual das amostras de felinos, provenientes do município de São Luís – MA, segundo a origem dos animais. São Luís, 201447
Tabela 02 – Distribuição percentual das amostras de felinos, provenientes do município de São Luís – MA, segundo o teste utilizado para detecção de FIV e a positividade para o vírus da FIV. São Luís, 201448
Tabela 03 – Distribuição das amostras de felinos, provenientes do município de São Luís – MA, segundo o teste utilizado para detecção de FIV e a positividade para o vírus da FIV. São Luís, 201452
Tabela 04 – Distribuição das amostras de felinos, provenientes do município de São Luís – MA, segundo a quantidade de testes com positividade para o vírus da FIV. São Luís, 201454
Tabela 05 – Análise comparativa entre os testes utilizados para detecção de FIV em amostras de felinos, provenientes do município de São Luís – MA. São Luís, 201455
Tabela 06 – Distribuição percentual das amostras de felinos, provenientes do município de São Luís – MA, segundo a presença de sinais clínicos e a positividade para o vírus da FIV. São Luís, 201457
Tabela 07 – Distribuição das amostras de felinos, provenientes do município de São Luís – MA, segundo a presença de co-infecções e a positividade para o vírus da FIV. São Luís, 201461
Tabela 08 – Valores médios e respectivos desvios-padrão das variáveis dos parâmetros hematológicos das amostras de felinos, provenientes do município de São Luís – MA, distribuídos segundo a positividade para o vírus da FIV. São Luís, 201462
Tabela 09 – Distribuição das amostras de felinos, provenientes do município de São Luís – MA, segundo os parâmetros hematimétricos e a positividade para o vírus da FIV. São Luís, 201463
Tabela 10 – Valores médios e respectivos desvios-padrão das variáveis dos parâmetros bioquímicos das amostras de felinos, provenientes do município de São Luís – MA, distribuídos segundo a positividade para o vírus da FIV. São Luís, 201465
Tabela 11 – Distribuição das amostras de felinos, provenientes do município de São Luís – MA, segundo os parâmetros bioquímicos sanguíneos e a positividade para o vírus da FIV. São Luís, 201466
Tabela 12 – Distribuição das amostras de felinos, provenientes do município de São Luís – MA, segundo as características do animal e a positividade para o vírus da FIV. São Luís, 201467
Tabela 13 – Distribuição das amostras de felinos, provenientes do município de São Luís – MA, segundo as características epidemiológicas e a positividade para o vírus da FIV. São Luís, 201468

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 01: Organização genômica do vírus da FIV, demonstrando o fragmento do gene <i>gag</i> descrito por Hohdatsu et al. (1992), com adaptações.....17
Figura 02: Representação gráfica esquemática da molécula do vírus da FIV. SU- Proteína de superfície; TM- Glicoproteína Transmembranária; PR- Protease; RT- Transcriptase Reversa; DU- dUTPase; IN- Integrase; MA- Proteína da matriz; CA- Proteína do capsídeo; NC- Nucleocapsídeo. Descrito por Bendinelli et al. (1995), com adaptações.....17
Figura 03: Interpretação do teste SNAP Combo FeLV/FIV – Ensaio imunoenzimático rápido para detecção do antígeno do vírus da Leucemia felina (FeLV) e dos anticorpos do vírus da Imunodeficiência felina (FIV): SNAP 1 – Amostra negativa para FIV e FeLV; SNAP 2 – Amostra positiva para FIV; SNAP 3 – Amostra positiva para FeLV; SNAP 4 – Amostra positiva para FIV e FeLV.....40
Figura 04 – Sequência de oligonucleotídeos utilizados utilizados na amplificação do fragmento de 244 pb do gene <i>gag</i> e sua localização no genoma. Adaptado de Hohdatsu et al., 1992.....43
Figura 05 – Distribuição percentual das amostras de felinos, provenientes do município de São Luís – MA, segundo o sexo dos animais. São Luís, 2014.....47
Figura 06 – Registro digital da corrida eletroforética em gel de agarose (1,5% em tampão TAE, corado com brometo de etídeo a 0,01%) da PCR para a detecção de porção do gene GAPDH cujo produto possui 709pb. Presença de DNA amplificável nas amostras utilizadas. 1 - Marcador de peso molecular 100pb; 2 - Controle negativo – água ultrapura; 3 a 22 - amostras positivas para o gene.....48
Figura 07 - Registro digital da corrida eletroforética em gel de agarose (1,5% em tampão TAE, corado com brometo de etídeo a 0,01%) da PCR para a detecção do gene <i>gag</i> , cujo produto possui 244pb. 1 e 10 - marcador de peso molecular 100pb; 2 - Controle positivo; 3 - Controle negativo; 4 e 9 - amostras negativas; 5, 6, 7 e 8 - amostras positivas.....51
Figura 08 - Registro digital de felinos, provenientes do município de São Luís – MA, com presença de sinais clínicos encontrados em animais positivos para o vírus da FIV. A - uveíte; B - quemose e conjuntivite; C - úlcera de córnea; D - esporotricose; E - secreção nasal serosanguinolenta; F - caquexia.....58
Figura 09 - Registro digital de felinos, provenientes do município de São Luís – MA, com alterações da cavidade oral observadas nos animais positivos para o vírus da FIV. A - Gengivite moderada; B - Gengivoestomatite; C - Gengivite; D - Estomatite....59
Figura 10 - Árvore filogenética construída pelo método de Neighbor-Joining e modelo de Tamura e Nei (1993) obtida pela análise de nove sequências de nucleotídeos do gene <i>gag</i> do vírus da imunodeficiência felina em São Luís, MA. A barra de escala representa 10% de divergência entre as sequências.....70
Figura 11 - Rede de haplótipos para as populações de FIV. O tamanho do círculo é proporcional à frequência com que os haplótipos ocorrem na população: H_1 (São Luis); H_2 (São Luis); H_3 (São Luis); H_4 (São Luis e SP); H_5 (São Luis); H_6 (São Luis); H_7, H_8, H_9, H_10, H_11 (amostras de outros países); H_12 e H_13 (Minas Gerais); H_14, H_15, H_16 (amostras de São Paulo); H_17 a H_21 (amostras de outros países).....72

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
AST	Aspartato aminotransferase
ALT	Alanina aminotransferase
ARC	Complexo Relacionado a Aids (“Aids Related Complex”)
AZT	3'-azido'3-desoxitimidina ou zidovudina
CA	Proteínas do Capsídeo
CD4/CD8	Marcadores de superfície celular de Linfócitos T
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DU	dUTPase
<i>env</i>	Gene que codifica proteínas do envelope
EDTA	Etilenodiaminatetracetato de sódio
ELISA	Ensaio imunoenzimático
EPO	Eritropoietina
FA	Fosfatase alcalina
FIV	imunodeficiência viral felina
FeLV	Vírus da leucemia felina
FNT	Fator de necrose tumoral
<i>gag</i>	gene que codifica as proteínas do capsídeo
GP	Glicoproteína
GM-CSF	Fator estimulante das colônias de macrófagos e granulócitos
HIV	Vírus da Imunodeficiência humana
IFA	Imunofluorescência indireta por Anticorpos
IFN	Interferão
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
IN	Integrase
LTR	Sequências longas repetidas (“Long Terminal Repeats”)
MA	Proteína da matriz
MI	Mililitro
Mg	Miligrama
mM	Milimolar
ma	miliampères
NC	Proteína de Nucleocapsídeo

nm	Nanômetro
ORF	Open Reading Frame
PCR	Reação em cadeia da polimerase("Polymerase Chain reaction")
Pb	Pares de bases
PR	Protease
<i>pol</i>	gene que codifica a enzima transcriptase reversa
RNA	Ácido ribonucleico
RT	Transcriptase Reversa
rFeIFN-ω	Interferão ômega recombinante felino
Rh-EPO	Eritropoietina recombinante humana
SU	Glicoproteína de superfície
TM	Glicoproteína Transmembrana
UEMA	Universidade Estadual do Maranhão
UFMG	Universidade de Minas Gerais
μL	Microlitro
%	porcento
ω	omega
®	marca registada
β	beta
κ	kappa
α	alfa
γ	gamma
°C	graus Celsius
Kg	quilograma
kV	Kilovolts

1 INTRODUÇÃO

A família ***Retroviridae***, cujo genoma é constituído por uma cadeia simples de ácido ribonucleico (RNA), divide-se em sete gêneros: *Lentivirus*, *Gammaretrovirus*, *Alpharetrovirus*, *Betaretrovirus*, *Deltaretrovirus*, *Epsilonretrovirus* e *Spumavirus* (PEREIRA & TAVARES, 2002; LAIRMORE, 2011). Todos os retrovírus possuem invólucro e utilizam a transcriptase reversa (TR) para sintetizar ácido desoxirribonucleico (DNA) (PEREIRA & TAVARES, 2002; DUNHAM & GRAHAM, 2008; LAIRMORE, 2011).

O vírus da imunodeficiência felina (FIV) é um retrovírus do gênero ***Lentivirus***, cuja infecção resulta em condições inflamatórias crônicas, neoplásicas e infecções secundárias. Os felinos naturalmente infectados apresentam imunossupressão, similar à síndrome da imunodeficiência adquirida humana (HIV/AIDS) e, dessa forma, representa um modelo animal útil para estudo da infecção (ETTINGER & FELDMAN, 2008) humana pelo HIV.

O FIV infecta preferencialmente células mononucleares do sangue periférico e apresenta maior tropismo por linfócitos T CD4⁺ (PAILLOT, 2005). Animais infectados desenvolvem anticorpos neutralizantes específicos contra as proteínas p15 e p24 do vírus entre duas e quatro semanas pós-infecção (ENGLISH, 1994) em títulos que se elevam gradualmente em algumas semanas como resultado da manutenção da infecção viral (YAMAMOTO, 1988).

Assim como todos os retrovírus, o FIV possui três genes principais: ***gag*** (codifica proteínas estruturais, sendo este o mais conservado), ***pol*** (produção da enzima transcriptase reversa – RT), e ***env*** (codificação das glicoproteínas de superfície importantes na interação com receptores celulares). Além dos genes acessórios ***vif*** (fator de infectividade viral) e ***rev*** (contribui para uma eficiente replicação e persistência) (TANG et al., 1999).

O vírus da leucemia felina (FeLV), também pertencente à família ***Retroviridae*** é do gênero ***Gammaretrovirus*** e pode infectar gatos domésticos e esporadicamente felinos selvagens. Está associado a uma série de doenças

degenerativas ou proliferativas, tais como leucemias e linfomas. A leucemia e o linfoma são manifestações incomuns da infecção provocada pelo FeLV nos animais persistentemente infectados, sendo mais frequente o desenvolvimento de anemias, doenças neurológicas e imunodeficiências (LEVY et al., 2008; TORRES et al., 2010).

Devido à ausência de quaisquer informações científicas sobre a existência de FIV/FELV no município de São Luís – MA, desenvolveu-se a pesquisa com o objetivo de avaliar aspectos clínicos, laboratoriais e epidemiológicos da imunodeficiência viral felina e leucemia felina no município de São Luís – MA, buscando-se verificar a ocorrência da infecção em felinos domésticos de diferentes localidades do município, contribuindo para identificar as reais condições a que estes animais se apresentam, bem como, elaborando um perfil clínico, laboratorial e epidemiológico das amostras, comparando-se com outros estados brasileiros.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Vírus e subtipos da imunodeficiência viral felina

O vírus da imunodeficiência viral felina (FIV) foi isolado pela primeira vez em 1986, em Petaluma, na Califórnia – EUA, num gatil, onde os felinos apresentavam sinais de imunodeficiência, mas eram soronegativos para o vírus da leucemia felina (FeLV). Devido ao seu tropismo por linfócitos, o vírus foi inicialmente designado como lentivírus felino T-linfotrópico (FTLV) (PEDERSEN et al., 1987).

Apenas em 1987, o vírus foi documentado (BENDINELLI et al., 1995; YAMAMOTO, PU, SATO & HOHDATSU, 2007) e, a sua designação vem do latim: *lenti*, pela capacidade que possuem de originar doenças de evolução crônica, com longos períodos de incubação e infecção persistente (PEREIRA & TAVARES, 2002).

O vírion tem forma esférica, 100-125nm de diâmetro, sendo envelopado, com ácido nucléico dimérico, consistindo de duas moléculas de RNA com fita simples de aproximadamente 9.200 bases (PEDERSEN & HO et al., 1987).

O genoma proviral do FIV possui duas extremidades longas repetidas (Long Terminal Repeat – LTR) com função reguladora da replicação viral e três genes estruturais (Figura 01) (MURPHY et al., 1999). O gene *gag* codifica as proteínas estruturais da matriz (MA) e capsídeo (CA) produzida na forma de poliproteínas que posteriormente será clivada para formar CA, MA e NC. (PANCINO et al., 1993).

O gene *pol* codifica proteínas enzimáticas presentes no interior do capsídeo: protease (PR), magnésio dependente de transcriptase reversa (RT), integrase (IN) e dUTPase (DU), que são necessárias para a maturação, transcrição reversa, integração e reparação genômica do vírus, respectivamente (MIYAZAWA et al., 1994; BENDINELLI et al., 1995). O gene *env* codifica as proteínas do envelope, de

superfície (gp 120) e transmembrana (gp 41) do vírion (Figura 02) (BENDINELLI et al., 1995).

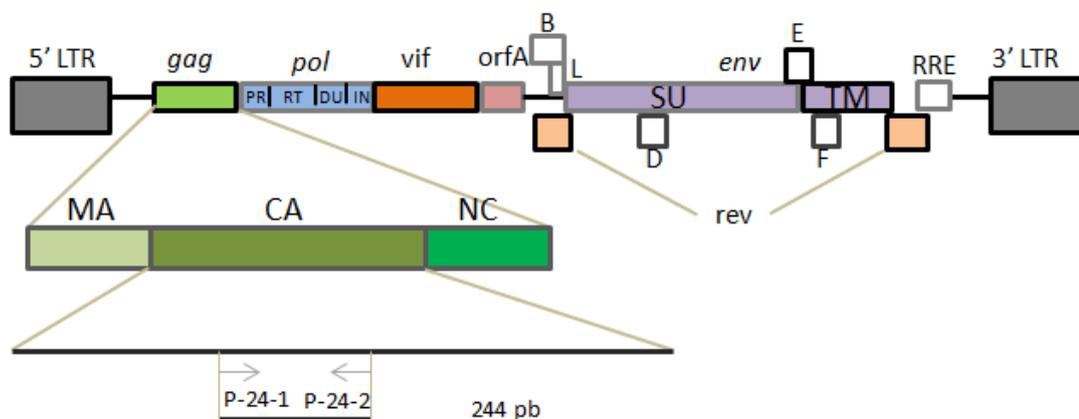


Figura 01: Organização genômica do FIV, demonstrando o fragmento do gene *gag* descrito por Hohdatsu et al. (1992), com adaptações.

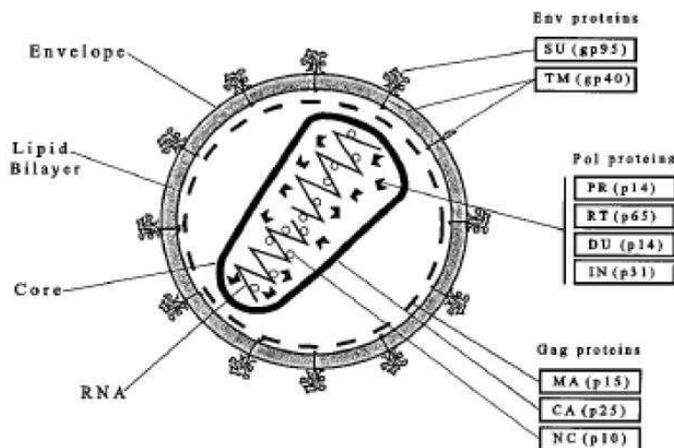


Figura 02: Representação gráfica esquemática da partícula vírica do FIV. SU- Proteína de superfície; TM- Glicoproteína Transmembranária; PR- Protease; RT- Transcriptase Reversa; DU- dUTPase; IN- Integrase; MA- Proteína da matriz; CA- Proteína do capsídeo; NC- Nucleocapsídeo. Descrito por Bendinelli et al. (1995), com adaptações.

Estudos baseados na sequência nucleotídica da região V3-V5 do gene *env* demonstraram a ocorrência de cinco subtipos diferentes do vírus da FIV (A, B, C, D e E) (KUSUHARA et al., 2005; DUNHAM, 2006), com cerca de 30% de diversidade entre cada subtipo (DUNHAM, 2006). Subsequentemente, estudos determinaram a possibilidade da mesma classificação genética para o FIV utilizando sequência de nucleotídeos da região p17-p24 do gene *gag*

(KAKINUMA et al., 1995, HOHDATSU et al., 1998, STEINRIGL & KLEIN 2003, DUARTE & TAVARES 2005).

Adicionalmente, o gene *gag* apresenta uma taxa de conservação mais elevada que o gene *env*. Entretanto, as mutações encontradas fazem deste último o candidato adequado para estudos filogenéticos (GREENE et al., 1993; HOHDATSU et al., 1998).

A distribuição geográfica destes subtipos é diferente, sendo o subtipo A mais comum na Europa, EUA e Austrália (DUARTE & TAVARES, 2006); o subtipo B no Japão, EUA e Europa (KUSUHARA et al., 2005; DUARTE & TAVARES, 2006); o subtipo C no Canadá, Europa, Taiwan e Vietnam; os subtipos D e E no Japão, Vietnam e Argentina (DUARTE & TAVARES, 2006) e os subtipos C e E, raramente descritos (DUNHAM, 2006). Os subtipos A e B incluem a maioria dos isolados virais obtidos. Têm ainda sido identificadas sequências recombinantes e classificadas como entre subtipos: A e B, B e D, e, ainda, A e C (DUARTE & TAVARES, 2006).

Os subtipos A e B têm sido os mais frequentemente identificados (DUARTE & TAVARES 2005) e estudos recentes demonstraram a ocorrência de subgrupos dentro do subtipo B (STEINRIGL & KLEIN 2003, WEAVER et al., 2004, DUARTE & TAVARES, 2005), refletindo a diversidade genética observada nos diferentes subtipos do FIV (SODORA et al., 1994, BACHMANN et al., 1997).

O subtipo B foi identificado em Minas Gerais através da metodologia de fragmentos de restrição de tamanhos variados (RFLP) (CAXITO et al., 2003) e, em São Paulo, por meio de sequenciamento genético (LARA et al., 2004). Estudos demonstram a existência de subgrupos dentro do subtipo B (LARA et al., 2007).

2.2 Epidemiologia e transmissão

Os felinos machos tem uma probabilidade três vezes maior de infecção pelo FIV que as fêmeas. Gatos de vida livre apresentam maior risco de infecção comparativamente àqueles que vivem estritamente dentro de casa,

enquanto pouquíssimos gatos de raças puras abrigados em gatis são infectados pelo FIV (BARR et al., 1994; ISHIDA et al., 1989).

A prevalência da infecção pelo vírus aumenta com a idade, sendo a média, no momento do diagnóstico por volta de cinco anos (BARR et al., 1994; ISHIDA et al., 1989). O aumento da infecção pode ser atribuída à agressão territorial mais notável e ao número desproporcional de feridas por exposição a mordeduras. Do mesmo modo, os gatos de vida livre tem possibilidade muito maior de contato agressivo com outros gatos do que os domiciliados, e, os gatos mais velhos, tem mais oportunidade para que tal contato ocorra. O sexo, a idade do animal e a densidade populacional são considerados fatores de risco na infecção pelo vírus da FIV (LAIRMORE, 2011).

Há diferenças na prevalência da doença em diferentes populações de países do mundo, sendo que esta varia numa taxa de 2,5% a 44% em diversos estudos epidemiológicos mundiais (LARA et al., 2008). Contudo, ao utilizar métodos moleculares essa prevalência diminui para 2% a 4% da população mundial de gatos (HAYWARD et al., 2007). Esta variabilidade na prevalência é atribuída à densidade populacional, estado reprodutor, idade, gênero e condições de moradia, em particular a frequência de visitas à rua e disputas por reprodução (NORRIS et al., 2007).

Nos Estados Unidos a prevalência da infecção pelo vírus da FIV foi estimada em 1,5% a 3% da população felina sadia e em 9% a 15% nos gatos que apresentavam alguma sintomatologia clínica (YAMAMOTO, 1989).

Na França, foram testados 9.951 gatos para FIV, pela técnica de detecção de anticorpos por ELISA, sendo encontrada uma prevalência de 15,4% (BRALEY, 1994). Em Madri, Espanha, a prevalência foi de 8,3% em 180 gatos saudáveis (ARJONA, 2000). Na cidade de Pisa, Itália, foi desenvolvida pesquisa com 203 gatos aparentemente saudáveis, onde foi encontrada uma prevalência de 11,3% (BANDECCHI et al., 2006).

Na Ásia, estudos realizados em Istambul, Turquia, em 103 gatos, encontrou-se prevalência de 22,3% para FIV (YILMAZ, ILGAZ & HARBOUR, 2000).

Na Tunísia (África), constatou-se prevalência de 20,5% para FIV (FRINI et al., 1998) e no Japão, a prevalência foi de 6,3% para a infecção pelo mesmo agente (MARUYAMA et al., 2003).

Em Sidney (Austrália), pesquisa realizada com 200 gatos saudáveis, revelou prevalência de 7,5% (MALIK et al., 2007).

No Brasil, o vírus da FIV já foi detectado por meio de pesquisas sorológicas e pela PCR, em gatos domésticos domiciliados e de rua, nos estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul e Minas Gerais com prevalências variando entre 2,0% e 37,5% para FIV e de 8,0% a 63% para FeLV (CALDAS et al., 2000; SOUZA et al., 2004; CAXITO, 2003; ALMEIDA et al., 2002).

2.3 Patogenia

O vírus atinge células do sistema mononuclear como linfócitos, monócitos e macrófagos, em órgãos como a medula óssea, timo, pulmão, tubo digestivo, cérebro e rim (SELLON & HARTMAN, 2006). Contudo, os linfócitos T-helper (Th), ou CD4⁺, são os principais tipos de células infectadas pelo FIV numa fase inicial da infecção (HOSIE et al., 2009).

Assim, nas primeiras semanas após infecção existe uma linfopenia que precede uma resposta imune ativa que é marcada pela produção de anticorpos (Ac's) anti-FIV, diminuição da carga viral e aumento persistente de linfócitos T citotóxico ou CD8⁺, com inversão de CD4⁺: CD8⁺ (HOSSIE et al., 2009).

O declínio progressivo das células CD4⁺ está associado ao favorecimento de infecções oportunistas. As células T citotóxicas específicas para o vírus provavelmente desempenham um papel importante no controle da replicação do FIV e na redução da viremia, especialmente durante uma infecção assintomática (BEATTY et al., 1996).

Em gatos experimentalmente infectados pelo FIV os anticorpos neutralizantes aparecem três a quatro semanas após a infecção. Entretanto, o vírus pode ser isolado de gatos infectados, apesar dos altos títulos de

anticorpos neutralizantes. Os anticorpos contra a glicoproteína do envelope e as principais proteínas do núcleo desenvolvem-se primeiramente, sendo que os anticorpos contra a proteína transmembrana e os produtos do gene *pol* em geral aparecem de quatro a oito semanas após a infecção (BARR et al., 1994; SPARGER, 1993).

Embora a maioria dos gatos desenvolva altos níveis de anticorpos dentro de algumas semanas após a infecção pelo FIV, alguns gatos apresentam respostas fracas ou tardias e outros perdem os anticorpos durante os estágios terminais da doença (BARR et al., 1994; SPARGER, 1993).

Felinos experimentalmente infectados apresentam sinais como uma alteração respiratória aguda transitória seguida de recuperação e um estágio assintomático extenso. O declínio de linfócitos é muito rápido durante o estágio agudo e continua caindo lentamente durante o curso da doença. Células infectadas são amplamente distribuídas em vários órgãos linfoides e não linfoides. Embora a maioria dos linfócitos de sangue periférico são portadores do vírus, células da linhagem de monócitos/macrófagos são sítios de infecção do vírus nos tecidos, durante os estágios mais avançados da doença. O FIV, assim como do HIV, são citotóxicos para os linfócitos T, enquanto os macrófagos são poucos susceptíveis a estas citotoxicidades (BEEBE et al., 1994).

2.4 Sinais clínicos

O período de incubação do FIV pode prolongar-se até vários anos após a infecção do agente (LAIRMORE, 2011), a maioria dos sinais clínicos demonstrados pelos animais infectados não está diretamente relacionada com o vírus em si, mas com outras causas, notadamente, infecções por agentes oportunistas e neoplasias devido à imunodepressão que se instala ou, por outro lado, doenças imunomediadas resultantes da estimulação do sistema imune (HOSIE et al., 2009).

Muitos gatos FIV positivos apresentam histórico de doenças recidivantes com períodos de recuperação intercalados com os episódios clínicos (ARAI et al., 2002).

Arjona et al. (2007) descreveram os sinais clínicos do FIV em cinco estágios, o primeiro caracterizado pela doença aguda, com sinais inespecíficos, podendo apresentar febre, depressão, linfadenopatia, neutropenia e diarréias auto-limitantes, porém outros animais podem não apresentar sintomatologia clínica.

O segundo estágio pode durar meses a anos, ou se prolongar por até mais de cinco anos, sendo este o período de portador assintomático. A terceira fase também leva de meses a anos e apresenta sinais clínicos não específicos como linfadenopatia generalizada, febre recorrente, apatia, leucopenia, anemia, anorexia, perda de peso, gengivite e estomatite (ARJONA et al., 2007).

A quarta fase é o complexo relacionado à AIDS (ARC), durando de meses a um ano, com alterações cutâneas, perda de peso, infecções respiratórias e diarréia crônicas, neoplasias (principalmente linfomas) e anormalidades neurológicas, além de infecções secundárias. O quinto e último estágio, caracteriza-se pela síndrome da imunodeficiência felina adquirida, durando meses com infecções oportunistas, como candidíase, criptococose, esporotricose, leucemia felina (FeLV), peritonite infecciosa felina (PIF) e anemia infecciosa felina (*Mycoplasma haemofelis*) (ARJONA et al., 2007).

Embora com menos frequência, poderão também ser observados episódios convulsivos, assim como alterações comportamentais resultantes de lesões inflamatórias no cérebro decorrentes de infecções com determinadas estirpes do FIV (LAIRMORE, 2011).

Os agentes oportunistas que desencadeiam infecções concomitantes com a infecção pelo FIV são variados como outros vírus, bactérias, fungos e parasitas (GRACE, 2011a).

Uma proporção significativa de gatos infectados com o FIV desenvolvem uveíte. A patogenia das lesões uveais não está clara, mas pode estar associada a mecanismos imunomediados, como deposição de

imunocomplexos, ou pela localização do vírus no tecido linfóide uveal. Felinos em estágios avançados da doença podem desenvolver uveíte como resultado de infecção secundária a uma variedade de organismos, incluindo PIFV (vírus da peritonite infecciosa felina), *Chlamydia psittaci* e *Toxoplasma gondii* (COLITZ, 2005; LA CROIX, 2005).

2.5 Diagnóstico

Os métodos atualmente utilizados para detecção da infecção por FIV em gatos incluem o isolamento do vírus, testes imunológicos diretos e indiretos além das técnicas moleculares. A especificidade e sensibilidade dos testes sorológicos são bastante satisfatórias, mas há relatos de resultados falso-positivos ou falso-negativos (HOSIE & JARRETT, 1990). Isolamento do FIV em cultura de células mononucleares de sangue periférico de gatos com sorologia negativa tem sido relatado (SPARKES, HOPPER et al., 1993). A soroconversão pode ocorrer após um período de até 14 meses pós-infecção (YAMAMOTO, SPARGER et al., 1988).

A Reação em cadeia da polimerase (PCR) permite a detecção do provírus, contudo a sua especificidade e sensibilidade tem sido descritas como altamente variáveis, desde 40% a 100% (LAIRMORE, 2011). É particularmente útil nos casos em que o animal possui o provírus, mas não produz anticorpos anti-FIV (SELLON & HARTMANN, 2006).

Um resultado positivo de PCR com sorologia negativa poderá ocorrer no caso de animais que vivam em contato íntimo com animais infectados e possuem o provírus, sem, no entanto, produzirem doença ou níveis de Ac's detectáveis (DANDEKAR et al., 1992). Estes animais são considerados infectados, mas a sua maioria sofre uma soroconversão em semanas ou meses (HOSIE, et al., 2009).

A ocorrência de falso-negativos poderá estar relacionada com número insuficiente de células infectadas na amostra ou presença de provírus defeituoso ao nível intracelular ou baixo número de cópias nos linfócitos (GRACE, 2011a).

A detecção do provírus em células sanguíneas por PCR também pode ser realizada, utilizando-se o DNA total extraído dos leucócitos, constituindo uma importante ferramenta para o diagnóstico da FIV. No entanto, a PCR pode apresentar falhas na detecção de vírus com variações genômicas (BACHMANN, MATHIASON-DUBARD et al., 1997; CAXITO, 2003; RAVAZZOLLO & COSTA, 2007) e a quantidade de vírus no sangue é pequena durante a fase assintomática da doença quando grande parte dos exames é realizada (PEDERSEN, YAMAMOTO et al., 1989).

O diagnóstico é, na maioria das vezes, realizado por detecção de anticorpos específicos anti-FIV, uma vez que na maior parte dos casos o nível antigênico se mantém abaixo do limiar de detecção (RICHARDS, 2006). São raros os casos reportados em que ocorre soroconversão apenas a partir dos seis meses após a infecção (HOSIE et al., 2009).

A desvantagem dos métodos disponíveis de diagnóstico sorológico é que nenhum consegue distinguir os anticorpos vacinais dos maternos ou os induzidos por infecção natural (GRACE, 2011a). Deste modo, filhotes que revelem presença de anticorpos anti-FIV deverão ser testados novamente às dezesseis semanas, para excluir a possibilidade de se tratarem de Ac's maternos em vez daqueles induzidos por infecção natural. Algumas vezes, os Ac's maternos persistem até os seis meses de idade, assim, animais soropositivos às dezesseis semanas, deverão ser re-testados dois meses depois. Para confirmação, ainda pode-se utilizar Western Blot ou PCR (SELLON & HARTMANN, 2006).

O isolamento viral é realizado em cultura de linfócitos T de sangue periférico do animal suspeito e células T primárias durante duas a três semanas. A presença do vírus é confirmada por medição dos níveis de proteínas virais nos fluidos da cultura (HOSIE et al., 2009). Apesar de altamente viável e de poder ser utilizado em qualquer fase da infecção, este é um processo dispendioso e requer conhecimentos específicos (LAIRMORE, 2011).

No Japão encontra-se já disponível um novo tipo de teste sorológico discriminatório, baseado em *Enzyme Lynked Immuno Sorbent Assay* (ELISA),

capaz de distinguir dos anticorpos produzidos por infecção natural (GRACE, 2011a).

2.6 Tratamento

Não existe tratamento definitivo para FIV, restando aos clínicos o controle sintomatológico das infecções secundárias e oportunistas além de terapia imunomoduladora positiva, capaz de melhorar a resposta imune do animal utilizando-se fármacos específicos. Algumas substâncias com atividade antirretroviral confirmada contra FIV não são utilizadas na prática clínica, devido a sua toxicidade e ao modo de administração (injeções diárias). Assim, a maioria das substâncias utilizadas na terapêutica, específicas para infecção por HIV, não está autorizada para uso veterinário (HOSIE et al., 2009).

O AZT (azidotimidina), também conhecido como zidovudina, é um análogo nucleosídeo que bloqueia a transcriptase reversa (TR) dos retrovírus. Tem a capacidade de integrar a cadeia de DNA em formação, o que, apesar de não interromper a replicação viral, impede a infecção de novas células por parte do vírus (SELLON & HARTMANN, 2006).

Existem estudos que indicam que o uso do AZT não reduz a carga viral das células mononucleares do sangue periférico, nem os títulos de anticorpos anti-FIV em gatos com infecção crônica (ARAI et al., 2002) embora promova uma melhoria transitória dos sinais clínicos e da relação $CD4^+ : CD8^+$ (ARAI et al., 2002; KOLENDA-ROBERTS et al., 2008).

Experimentalmente foi demonstrada uma melhoria clínica no que diz respeito à estomatite (SELLON & HARTMANN, 2006; HOSIE et al., 2009). No entanto, os animais sujeitos a este tratamento devem ser monitorados quanto ao desenvolvimento de anemia e neutropenia, sendo necessário realizar hemogramas semanalmente, o que limita o uso prolongado deste fármaco em doses elevadas para a rápida melhora clínica (ARAI et al., 2000).

Caso os valores se mantenham estáveis durante um mês de tratamento, então um hemograma mensal será suficiente. Se o valor do hematócrito descer abaixo dos 20% é recomendada a descontinuação do

tratamento, para que os valores normalizem o que geralmente acontece em poucos dias (HOSIE et al., 2009).

Os efeitos secundários associados a esta terapêutica podem ser atenuados pela associação do AZT a fatores de crescimento hematopoiético, como o fator estimulante das colônias de macrófagos e granulócitos (GM-CSF) e à eritropoietina (EPO) (ARAI et al., 2000; ARAI et al., 2002).

O interferon- γ (IFN- γ) felino, recentemente licenciado para uso veterinário na união europeia e no Japão (HOSIE et al., 2009), é específico da espécie e o uso prologando desta substância não induz produção de anticorpos, não havendo, até ao momento, descrição de efeitos adversos em felinos (HOSIE et al., 2009).

Num estudo recente, animais FIV/FelV positivos sintomáticos, submetidos a este tratamento, apresentaram diminuição da taxa de mortalidade, com melhorias mínimas mas consistentes, dos parâmetros hematológicos alterados e melhorias dos sinais clínicos associados (MARI et al., 2004; LANORE, 2004).

Um ensaio clínico com utilização de IFN- γ humano em gatos demonstrou um aumento da sobrevivência dos linfócitos T CD4⁺ (PEDRETTI et al., 2006). Foi descrito o aparecimento de anticorpos neutralizantes entre três e sete semanas após início do tratamento (ZEIDNER et al. 1990). A administração parenteral de IFN- γ parece conduzir a um maior efeito anti-viral que a administração por via oral, talvez devido à menor absorção do IFN ao nível gastrointestinal, o que não elimina a possibilidade de estimulação local do tecido linfóide da cavidade oral (SELLON & HARTMANN, 2006).

Este mediador químico, quando administrado oralmente em doses baixas (1-10 UI/Kg) não tem capacidade anti-viral direta *in vivo*, devido à sua digestão proteolítica no trato gastrointestinal. No entanto, promove um aumento da resposta imunitária às infecções virais através da modulação de importantes citocinas como a IL-1, IL-5, IL-6, IL-8 e o GM-CSF, aumentando a sobrevivência dos linfócitos T CD4⁺ e aumentando o número de linfócitos T CD8⁺ (PEDRETTI et al., 2006).

Por outro lado, por administrado oralmente em doses baixas e, conseqüentemente, digerido ao nível gastrintestinal, não leva à indução de resposta humoral anti-IFN- γ humano, ao contrário do que ocorre na sua administração parenteral em doses elevadas (10^5 - 10^6 UI/Kg). Este fato limita a sua administração a um máximo de seis a sete semanas. A terapêutica oral com doses baixas aumentou significativamente o tempo de vida dos gatos FIV positivos e provocou uma melhoria clínica, em nada relacionada com a viremia ou com a carga proviral leucocitária (PEDRETTI et al., 2006).

2.7 Profilaxia

O modo de transmissão mais comum é por meio da mordedura, para a prevenção recomenda-se que o animal não tenha acesso à rua e contato com outros gatos. A castração, tanto dos machos como das fêmeas, diminui o comportamento agressivo. As fêmeas soropositivas não devem reproduzir, minimizando deste modo as chances de transmissão materno-fetal. Evitar superpopulação de gatos no mesmo ambiente também é indicado, pois reduz as chances de contato com um animal soropositivo e também as chances de brigas (AVERY, 2001).

A vacinação contra FIV com vírus inativado resulta numa produção rápida de anticorpos anti-FIV, que poderão persistir por mais de três anos. A vacina para o FIV está apenas legalizada nos EUA, não sendo utilizada em outros países, de modo a evitar o aparecimento de anticorpos vacinais na amostra populacional felina desses países o que dificultaria o diagnóstico sorológico (LAIRMORE, 2011).

2.8 Vírus e subtipos da leucemia felina

O FeLV foi descrito pela primeira vez, em 1964, na Escócia, por Willian Jarret, que isolou partículas virais a partir de um grupo de gatos com linfoma. Utilizando-se de microscopia eletrônica, descreveu que o agente infeccioso era aparentemente similar ao vírus da leucemia de murinos (MuLV),

o que posteriormente confirmou-se como sendo um retrovírus. Desde então, o FeLV foi reconhecido como modelo de estudo da patogênese molecular da subfamília *Gammaretrovirus*. Além disso, exerce papel fundamental como modelo em pesquisas genéticas sobre câncer e retrovirose (HARTMANN, 2006).

O vírus da FeLV faz parte da família *Retroviridae*. As diferenças na morfologia, replicação, expressão e função das proteínas virais, o incluem na subfamília *orthoretovirinae*, gênero *gammaretrovirus* (FENNER, 2011).

São agentes exógenos capazes de se replicar em diversos tecidos (linfócitos, medula óssea, glândulas salivares e epitélio respiratório). Trata-se de um vírus não citopatogênico, cuja liberação das células infectadas é feita por meio de brotamento. Durante a replicação, o vírus insere cópias do genoma viral no DNA das células precursoras hematopoiéticas e, dessa forma, o vírus persiste no organismo do felino (HARTMANN, 2011).

O genoma do FeLV contém três genes separados que codificam diferentes proteínas necessárias para a geração de novos vírus. O primeiro gene é chamado de *gag* e codifica proteínas para a formação do capsídeo. O segundo gene é chamado de *pol* responsável pela codificação da transcriptase reversa e outras proteínas necessárias para o genoma do FeLV ser integrado ao genoma do gato hospedeiro. O último é chamado de *env* e codifica as proteínas necessárias para formação do envelope (SOUZA & TEIXEIRA, 2003).

As proteínas do núcleo viral (p10, p12, p15, p27 e RT) são imunogênicas, porém os anticorpos gerados não são eficazes para a neutralização do vírus (COTTER, 1998). A principal proteína antigênica do FeLV é a p27, a qual é detectada pelos testes comercializados para FeLV (SOUZA & TEIXEIRA, 2003). A principal proteína do envelope é a gp70 que varia de acordo com o subgrupo viral. Os anticorpos anti-gp70 são tipo específicos, neutralizantes, propiciam a imunidade, a reinfecção por vírus do mesmo subgrupo e são os mais importantes para imunização natural e vacinal (ETTINGER & FELDMAN, 1995).

No processo da transcrição reversa, são adicionados cerca de 300-1300 pares de base em cada extremidade da molécula de DNA viral. Essas sequências terminais são denominadas LTR e constituem-se de três elementos: U3, R e U5, além de pequenas sequências repetidas e invertidas nas extremidades. Os LTRs delimitam a extremidade do provirus inserida na célula hospedeira e sua principal função é sinalizar o início da síntese de RNA e controlar a taxa de transcrição, de acordo com fatores celulares e virais. Possuem grande importância na replicação do retrovírus, além de apresentarem sequências promotoras e potencializadoras no U3, envolvidas na oncogênese relacionada aos vírus (FENNER, 2011).

Atualmente o FeLV é classificado em quatro subtipos: A, B, C e T, que se diferenciam geneticamente por variações na sequência do gene *env*, e funcionalmente por testes de interferência (o vírus de um subgrupo interfere na infecção na mesma célula por outro vírus do mesmo subgrupo) e de neutralização viral, além da habilidade de replicação em tecidos não felinos (NEIL, 2008).

O FeLV-A é facilmente transmitido entre os gatos, e, uma vez dentro da célula, é capaz de se recombinar com as sequências do enFeLV (FeLV endógeno) ou sofrer mutações, originando os subtipos recombinantes B e C, respectivamente (STEWART et al., 2011). A replicação dos subtipos B e C só é possível na presença do FeLV-A, pois muitas sequências importantes para a replicação são substituídas nos recombinantes.

Todos os isolados de animais naturalmente infectados possuem somente o FeLV-A, ou a combinação com o FeLV-B, FeLV-C ou ambos. Os vírus recombinantes são mais patogênicos do que o FeLV-A, devido a propriedades diferentes nas proteínas do envelope. O FeLV-B está fortemente associado ao surgimento de neoplasias e é isolado com mais frequência do que o FeLV-C, um subtipo raro, normalmente observado em animais com anemia não regenerativa (HARTMANN, 2006).

Um quarto subtipo FeLV-T, foi descoberto recentemente, sendo bastante citolítico para linfócitos T e está associado à imunossupressão grave. Esta variante linfotrópica requer meios mais complexos para penetrar na célula

e não se replica em fibroblastos felinos. Ao que tudo indica, esse subtipo utiliza o receptor do FeLV-A e um mecanismo auxiliar com correceptor codificado pelo enFeLV (NEIL, 2008).

A forma infecciosa mais comum é o FeLV-A, que, de acordo com análises genéticas e sorotípicas, é bastante conservado geneticamente (NEIL, 2008). Apesar de ser mais virulento, o FeLV-A é menos patogênico (HARTMANN, 2006). As variantes do FeLV-A dependem da presença desse subtipo para se propagar *in vivo*. Logo, já que as variantes são dificilmente transmitidas e, em alguns casos, fatais, elas tendem a desaparecer com o hospedeiro, enquanto o FeLV-A, continua a infectar novos animais.

A variante mais isolada é o FeLV-B, formado pela recombinação entre o FeLV-A e o enFeLV. Embora essas sequências endógenas não sejam capazes de gerar infecções ativas, as porções correspondentes ao envelope recombinam-se com o FeLV-A, originando o FeLV-B, capaz de colonizar células previamente infectadas pelo FeLV-A, uma vez que ambos utilizam receptores diferentes (NEIL, 2008).

Acredita-se que o processo de recombinação resulte da expressão de sequências virais endógenas e junção dos transcritos dentro de partículas virais exógenas. O FeLV-C é o resultado de mutações num domínio variável (VRA) no gene *env* do FeLV-A. Mutações menores neste gene parecem estar envolvidas no surgimento do FeLV imunossupressor, FeLV-T (NEIL, 2008).

2.9 Epidemiologia e transmissão

O FeLV é enzoótico na população de gatos domésticos e já foi documentado em felídeos selvagens de diversas partes do mundo (BROWN et al., 2008). Trata-se de um vírus de prevalência abaixo de 2% em gatos assintomáticos, mas pode chegar a 30% em animais doentes ou constantemente expostos ao vírus (FENNER, 2011; HARTMANN, 2006). Estudos epidemiológicos demonstram que o vírus da FeLV está disseminado em vários países e que sua ocorrência varia de acordo com a região geográfica (HAGIWARA et al., 1997; SOUZA et al., 2002).

Existe relatos de 16,7% de animais positivos na Costa Rica (BLANCO et al., 2009) e 23,3% na Colômbia (TIQUE et al., 2009). Na Espanha, 30,4% dos gatos sintomáticos são positivos para FeLV e 15,6% dos saudáveis foram positivos para o vírus (ARJONA et al., 2000). Nos EUA, detectou-se 4,3% de gatos de rua com FeLV, enquanto no Canadá, a frequência encontrada foi de 3,4% (LITTLE et al., 2009). Em Portugal (DUARTE et al., 2010) e na Alemanha (GLEISH et al., 2009) foram observadas as menores frequências: 7,1% e 3,6%, respectivamente.

No Brasil, estudos sorológicos realizados em São Paulo e no Rio de Janeiro mostraram que a prevalência varia de 12,5% a 20,3%, respectivamente (HAGIWARA et al., 1997; SOUZA et al., 2002). Em Belo Horizonte (MG), estudo sorológico realizado em abrigos de gatos detectou prevalência de 22,5% em fêmeas e de 10% em machos (TEIXEIRA et al., 2007). No mesmo estado se detectou DNA proviral do FeLV em 47,5% de 507 animais testados (COELHO et al., 2011).

O vírus da FeLV geralmente é transmitido por contato oronasal e a transmissão horizontal é a mais importante, já que gatos infectados liberam vírus constantemente, apresentando sinais clínicos ou não (ROJKO & HARDY, 1994). A transmissão primária é pela saliva, onde há maior concentração de vírus do que no plasma (COTTER, 1998). Também existe grande número de vírus presente nas secreções respiratórias (ARJONA, 2000). Há possibilidade de transmissão por mosquitos, pois já foi encontrado o vírus no aparelho bucal deste inseto (ROJKO & HARDY, 1994). Já a urina e fezes são vias menos possíveis de propagação do FeLV (COTTER, 1998). Transmissão iatrogênica pode ocorrer por agulhas contaminadas, instrumentos, fômites e transfusão sanguínea (COTTER, 1998). Os gatos saudáveis persistentemente infectados constituem o principal reservatório do vírus da FeLV. As mordeduras podem ser um modo de transmissão mais importante nos gatos (MERCK, 2006).

A incidência em gatos jovens é superior a de adultos, pois há uma resistência relacionada com a idade: animais com até 12 semanas são mais susceptíveis ao FeLV, enquanto aqueles acima de 16 semanas são difíceis de

infectar natural ou experimentalmente (NEIL, 2008; HARTMANN, 2006; GRANT et al., 2009). Essa resistência independe do contato prévio com o vírus ou vacinação. Tal fato pode ter relação com uma diminuição no número de receptores celulares para o FeLV-A, ou maturação na função dos macrófagos (HARTMANN, 2006).

2.10 Patogenia

As consequências da infecção pelo FeLV dependem não só da condição imune e da idade do animal, mas também da patogenicidade do vírus, frequência de exposição e concentração viral (HARTMANN, 2006). A infecção pode ser classificada como abortiva, regressiva, latente ou progressiva (TORRES et al., 2005). Os mecanismos responsáveis pelas diferentes formas de infecção ainda não foram completamente esclarecidos, contudo, há evidências de que a resposta celular inicial e a resposta humoral tardia tenham relação direta com os efeitos da exposição inicial (FLYNN et al., 2002).

Após a infecção inicial o vírus se replica no tecido linfóide local, a partir daí, os animais são classificados conforme sua capacidade imunológica. Gatos imunocompetentes eliminam o vírus nessa fase caracterizando a infecção abortiva e, portanto, são negativos em todos os testes diagnósticos. Contudo, alguns apresentam anticorpos contra o vírus da FeLV, logo, podem ser identificados em testes sorológicos. Estes animais, denominados gatos regressores, representam cerca de 60% dos casos (NEIL, 2008).

Caso não haja resposta imune local efetiva, o vírus se dissemina no interior dos monócitos e linfócitos para vários tecidos alvos como o timo, baço, linfonodos e glândulas salivares, onde se replica. Nessa fase, é possível detectar a p27 livre no plasma e o animal é capaz de transmitir o vírus. Se o sistema imune conseguir debelar a infecção antes que a medula óssea seja atingida, condição que ocorre em três semanas aproximadamente, ocorre a viremia transitória, quando o animal consegue eliminar completamente o vírus (infecção regressiva) (HARTMANN, 2006).

Porém, após a contaminação das células precursoras da medula óssea, o vírus replica-se em diversos órgãos, principalmente em tecidos linfoides e glândulas salivares, e, é possível detectar antígenos virais livres no plasma e no interior de plaquetas e granulócitos (HARTMANN, 2006).

Esses animais não eliminam partículas virais, logo, não transmitem o vírus e são negativos nos testes que se baseiam na detecção de antígenos. São identificados apenas utilizando-se cultivo celular do aspirado da medula óssea ou por testes moleculares. Contudo, a infecção latente pode ser reativada em casos de imunossupressão. Há relatos de infecção latente em outros tecidos, tais como glândula mamária, bexiga, olhos, linfonodos e intestinos (HARTMANN, 2006; LINENBERGER et al., 1998).

No entanto, se o gato infectado não conseguir estabelecer uma resposta imune efetiva em nenhum momento, ele torna-se persistentemente infectado. Nesse caso, o vírus se replica continuamente na medula óssea, baço, linfonodos e glândulas salivares o que leva ao desenvolvimento das doenças relacionadas com o vírus da FeLV e à morte dentro de três anos (HARTMANN, 2006). Cerca de 30% a 40% dos gatos expostos ao vírus desenvolvem viremia persistente e com grande risco de desenvolver as síndromes relacionadas ao mesmo (LINENBERGER et al., 1998).

Embora a latência seja uma sequela da infecção pelo vírus da FeLV, a maioria dos animais latentes consegue eliminar completamente os genes virais dentro de nove a 16 semanas, e cerca de 10% dos gatos o faz após 30 meses de infecção latente (NEIL, 2008).

Portanto, a reativação da infecção latente torna-se cada vez mais difícil, mesmo em condições de imunossupressão, provavelmente devido a alterações genéticas durante a rápida divisão celular das células hematopoiéticas, o que levaria à perda da informação para produzir novas partículas virais. Por isso, acredita-se que a latência seja um estágio do processo de eliminação. No entanto, a simples presença do provirus no genoma pode causar alterações sistêmicas, tais como mielossupressão e neoplasias hematopoiéticas, por meio da interrupção/inativação de importantes genes ou por alteração na expressão de genes próximos (NEIL, 2008).

Animais FeLV positivos, com ou sem sintomatologia, geralmente não desenvolvem uma quantidade adequada de anticorpos contra o vírus, enquanto gatos FeLV negativos, que não foram expostos ao vírus, possuem índices neutralizantes de anticorpos contra o vírus e são resistentes à infecção. De acordo com Flynn et al. (2002) nenhum dos gatos que desenvolveram a viremia permanente apresentam anticorpos neutralizantes contra o FeLV.

Dentre os animais que se tornam persistentemente virêmicos, 80% morrem dentro de 3,5 anos. A maioria dos gatos jovens morre de doenças regenerativas, contudo, a imunossupressão grave associada com atrofia do timo é um achado comum em filhotes. O vírus da FeLV é encontrado em associação com 35% dos linfomas alimentares (NEIL, 2008).

2.11 Sinais Clínicos

As manifestações associadas ao vírus da FeLV são divididas em doenças proliferativas ou degenerativas. Desordens hematológicas, particularmente citopenias devido a suspeita de mielossupressão, são achados comuns em felinos infectados pelo vírus da FeLV. Desordens hematológicas não neoplásicas incluem, síndrome mielodisplásica; anemia aplásica (pancitopenia); neutropenias cíclicas, persistentes ou transitórias; síndrome panleucopênica e anormalidades de plaquetas. Cerca de 10% das anemias associadas à FeLV são regenerativas e causadas por hemólise imunomediada ou secundárias às infecções por hemoplasmas e o restante das anemias relacionadas a FeLV (90%) são arregenerativas e causadas por mielossupressão (STUTZER ET AL., 2010).

2.12 Diagnóstico

A infecção por esse retrovírus pode ser diagnosticada pela detecção do antígeno viral p27 nos leucócitos, plasma, soro, lágrimas ou saliva dos animais infectados. Os testes mais utilizados são os ensaios de imunofluorescência por anticorpo (IFA) e o ensaio imunoenzimático direto

(TORRES et al., 2010). Entretanto, teste moleculares como a reação em cadeia da polimerase estão cada vez mais sendo utilizados devido às vantagens sobre os testes sorológicos, pois, além de detectarem e identificarem os agentes virais, permitem também caracterizá-los geneticamente (TANDON et al., 2008).

Uma técnica baseada em PCR foi desenvolvida num estudo para a detecção de FeLV, FIV e retrovírus endógenos. Este teste demonstrou-se sensível, específico, rápido, conveniente e a sua aplicabilidade no diagnóstico clínico promissora, uma vez que a evidência direta da presença de vírus se torna mais realística do que a informação indireta fornecida pela detecção sorológica (ARJONA et al., 2007).

Outro teste foi também desenvolvido, baseado em RT-PCR em tempo real, com uma sensibilidade de 92% e uma especificidade de 99%, capaz de detectar um elevado número de gatos com uma baixa carga proviral de FeLV que se apresentaram negativos a outros testes de diagnóstico, sendo também bastante útil para monitorar os níveis provirais em animais com infecção persistente (PINCHES et al., 2007b).

Dos testes disponíveis para o diagnóstico de FeLV, um resultado negativo ao RT-PCR em tempo real é o resultado mais confiável para diagnosticar um animal como sendo FeLV negativo (HOFMANN-LEHMANN et al., 2007; PINCHES et al., 2007b).

O diagnóstico diferencial entre o vírus da FIV e da FeLV é muito difícil de realizar, uma vez que os sinais clínicos associados são muito semelhantes e inespecíficos, o que torna de grande utilidade na prática clínica, o kit de diagnóstico comum a FIV e FeLV (ARJONA et al., 2007; HARTMANN et al., 2007).

Dessa forma, os diagnósticos da FeLV usualmente se baseiam em testes capazes de detectar o vírus ou alguma partícula viral (TORRES et al., 2005). Cerca de 50% dos gatos com acesso à rua tem evidências sorológicas de exposição ao FeLV, mas apenas 1% a 5% desses gatos estão permanentemente infectados pelo vírus e a incidência de doenças é correspondentemente baixa (NEIL, 2008).

O isolamento viral (TANDON et al., 2005; GOMES-KELLER et al., 2006b) a partir de sangue total, considerado como o *gold standard* por alguns investigadores, pode ser negativo em animais com provírus de DNA no seu genoma. Estes animais são considerados como tendo infecção latente durante vários meses, sugerindo que o genoma viral é replicado e transmitido às células filhas. Observou-se ainda que alguns gatos possam deprimir a replicação do vírus da FeLV para níveis indetectáveis até 8,5 anos pós-infecção, demonstrando que o vírus pode persistir numa forma inativa durante anos (GOMES-KELLER et al., 2006b).

2.13 Tratamento

Drogas antirretrovirais podem alterar a replicação viral, seja inibindo a transcriptase reversa (RT) ou interferindo na produção de proteínas virais. Os resultados são efetivos apenas quando o tratamento é iniciado até três semanas após a infecção, antes da infecção de células da medula óssea [31]. Alguns exemplos de inibidores da RT são suramina, fosfonoformato e HPA-23. Já os inibidores proteicos são a lamivudina, dideoxicitidina (DDC), dideoxinosina (DDI) e zidovudina (AZT), embora existam relatos de que podem causar hepatotoxicidade ou agravar a mielossupressão (COTTER et al., 1991).

2.14 Profilaxia

Vacinas preparadas com vírus completo inativado obtido a partir de cultivos celulares são disponíveis comercialmente, assim como as vacinas recombinantes contendo proteínas virais expressas em sistemas heterólogos. A imunização dos animais com vacinas inativadas pode resultar em uma redução de 70 % de incidência da doença (RAVAZZOLLO & COSTA, 2007).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar aspectos clínicos, laboratoriais e epidemiológicos da imunodeficiência viral felina no município de São Luís – MA.

3.2 Específicos

- Determinar a ocorrência dos vírus da imunodeficiência felina e da Leucemia felina no município de São Luís – MA;
- Caracterizar alterações clínicas em felinos positivos para FIV/FeLV;
- Avaliar valores hematológicos e bioquímicos de animais positivos e negativos para FIV/FeLV;
- Verificar possíveis associações entre FIV e FeLV, correlacionando o diagnóstico das enfermidades com características clínicas, laboratoriais e epidemiológicas;
- Comparar as técnicas de PCR, ELISA indireto e Snap Combo FIV/FeLV para o diagnóstico do vírus da Imunodeficiência Viral Felina realizando teste estatístico de sensibilidade, especificidade e índice de concordância (Kappa) entre os testes.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Para composição da amostra foram utilizados gatos domésticos (*Felis catus domesticus*), independentemente de sexo, raça, idade e modo de vida, apresentando ou não sinais clínicos de qualquer doença.

4.2 Composição da amostra

Os elementos componentes da amostra foram selecionados aleatoriamente de maneira não probabilística por conveniência, sendo oriundos:

- 1 – dos atendimentos do Hospital Veterinário Universitário “Francisco Edilberto Uchôa Lopes” da Universidade Estadual do Maranhão;
- 2 – de atendimentos de clínicas veterinárias particulares do município de São Luís – MA;
- 3 – animais errantes do campus da UEMA; e,
- 4 – gatos mantidos em abrigos de animais no município de São Luís – MA.

4.3 Local

A pesquisa foi desenvolvida em etapas, a saber:

- 1 – Coleta: Conforme amostra;
- 2 – PCR: Retrolab/UFMG;
- 3 – ELISA indireto: Retrolab/UFMG;
- 4 – SNAP Combo FIV/FeLV: LabImuno/CCA/UEMA;
- 5 – Hematologia e Bioquímica: Laboratório de Patologia Clínica/CCA/UEMA.

4.4 Autorização à pesquisa e ficha clínico-epidemiológica

A presente pesquisa foi submetida e aprovada pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal (CEEA) do Curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual do Maranhão – UEMA, sob protocolo de número ____/2014.

Para inclusão dos animais na pesquisa, foram coletadas autorizações dos tutores através de termo de consentimento livre e esclarecido.

Neste mesmo momento, dados referentes ao animal, tutor e situação clínica, além de informações epidemiológicas, foram coletados e registrados em ficha específica (Apêndice 01).

4.5 Coleta de amostras

Foram coletados 2mL de sangue de cada animal por punção da veia jugular externa, utilizando-se tubos tipo “vacutainer” contendo anticoagulante EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético), acoplado a agulha 25 x 0,8mm, estéreis, para exames hematimétricos e PCR. Do mesmo vaso e, no mesmo momento, utilizando-se tubos tipo “vacutainer” sem anticoagulante, acoplado a agulha 25 x 0,8mm, estéreis, coletou-se ainda, 2mL de sangue, para extração de soro utilizado na avaliação dos perfis bioquímicos e exames sorológicos.

4.6 Processamento de amostras

4.6.1 Exame hematimétrico

No Laboratório de Patologia Clínica do Curso de Medicina Veterinária da UEMA, foram avaliadas as séries vermelha e branca a partir de sangue total. O volume corpuscular médio (VCM) e concentração de hemoglobina média (CHCM) foram determinados por cálculo padrão. As proteínas plasmáticas totais (PPT) foram determinadas com o auxílio de refratômetro. Os esfregaços sanguíneos foram corados pelos métodos

Panótico e Giemsa para realização o diferencial leucocitário com observação da morfologia das células sanguíneas e pesquisa de hemoparasitas (*Babesia felis*, *Ehrlichia felis* e *Mycoplasma Haemofelis*). As técnicas utilizadas seguiram protocolo descrito por KANECO et al. (1997).

4.6.2 Perfil bioquímico

Após centrifugação das amostras de soro sanguíneo, no Laboratório de Patologia Clínica do Curso de Medicina Veterinária da UEMA, foram determinadas as concentrações séricas de uréia, creatinina, proteína sérica total, albumina e determinaram-se as atividades séricas de alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e fosfatase alcalina (FA). Utilizaram-se Kits bioquímicos veterinários específicos (Labtest®), seguindo recomendações do fabricante e a leitura foi realizada em analisador bioquímico semi-automático (Bio 2000-Bioplus) (KANECO et al., 1997).

4.6.3 Detecção de anticorpos contra o FIV e antígenos do FeLV

As amostras de soro foram submetidas a testes para verificar a presença de anticorpos contra a proteína p24 do FIV e a presença da proteína p27 do FeLV utilizando o kit comercial SNAP Combo Plus (IDEXX Laboratories) no Laboratório de Imunodiagnóstico (LABImuno) do Curso de Medicina Veterinária da UEMA, sendo interpretadas conforme as recomendações do fabricante (Figura 03).



Figura 03: Interpretação do teste SNAP Combo FeLV/FIV – Ensaio imunoenzimático rápido para detecção do antígeno do vírus da Leucemia felina (FeLV) e dos anticorpos do vírus da Imunodeficiência felina (FIV):

- SNAP 1 – Amostra negativa para FIV e FeLV;
- SNAP 2 – Amostra positiva para FIV;
- SNAP 3 – Amostra positiva para FeLV;
- SNAP 4 – Amostra positiva para FIV e FeLV.

4.6.4 ELISA r-p24

No Laboratório de Retrovíroses (Retrolab) da Escola de Veterinária da UFMG, realizou-se a técnica de ELISA indireto de acordo com Alves et al. (2013). As placas de ELISA (Maxsorb, Nunc, Hampton, NH, USA) foram adsorvidas com três diferentes concentrações do antígeno recombinante r-p24 (250ng, 500ng e 1µg/poço) em tampão (carbonato 0,015M/bicarbonato 0,035M pH 9,6) a 4°C por 18 horas. Em seguida a placa foi lavada duas vezes (200µL cada) com PBS 1X + Tween 20 (0,05%). Após as lavagens, foi realizado bloqueio dos sítios inespecíficos de ligação, incubando-se com PBS 1X adicionado de 5% leite em pó desnatado por 1 hora em temperatura ambiente. Novamente, foram realizadas duas lavagens (200µL cada) com PBS + Tween 20 (0,05%). Em seguida diluições seriadas dos soros de dois animais, um positivo e um negativo (1:20 a 1:1280) foram realizadas em PBS 1X adicionado de 2% leite em pó desnatado, após o que se adicionou 100 µL de cada diluição, foram adicionados em cada poço da placa deixando por uma hora em temperatura ambiente. Seguiu-se três lavagens com PBS 1X + Tween 20 (0,05%) e foram testadas diluições seriadas entre 1:5000 e 1:7500 do conjugado (HRP Conjugated Goat anti-Cat IgG Fc) (Immunology Consultants Lab) em 100µL de PBS 1X adicionado de 2% leite em pó desnatado, em cada poço da placa, deixando reagir por uma hora em temperatura ambiente. Três novas lavagens foram realizadas com PBS 1X + Tween 20 (0,05%) e foi adicionado em cada poço 100µL do substrato para peroxidase (ácido cítrico 0,1M, fosfato de sódio 0,2M, H₂O₂ (30 volumes) (MERCK, Darmstadt, Germany) na diluição 1:1150 e 0,3mg/mL de Orto-fenil-diamina (OPD) (Sigma Aldrich, VA, USA), incubando-se por 15 minutos. Seguido este período a reação foi interrompida com 40µL de H₂SO₄ (4N) e foi realizada em leitor de ELISA a um comprimento de onda à 490nm. Todos os soros foram avaliados em duplicata.

Após as análises foi estabelecida a utilização da diluição de 1:320, 250ng e 1:7500 das diluições do soro, concentração do antígeno e diluição do conjugado, respectivamente, para o diagnóstico indireto da infecção pelo FIV

pela técnica de ELISA. Após padronização, todas as 120 amostras foram testadas nestas condições.

4.6.5 Extração do DNA proviral

A extração DNA foi precedida utilizando o kit QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) lote numero: 13270837, no laboratório Retrolab da Escola de Veterinária da UFMG, seguindo criteriosamente o protocolo e recomendações do fabricante. Com o objetivo de estabelecer a mesma concentração de DNA para todas as amostras, as mesmas foram quantificadas em espectrofotômetro (NanoVue Plus Spectrophotometer) (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) utilizando-se uma alíquota de 2µL e posteriormente armazenadas a - 20°C até a realização da PCR.

4.6.6 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

4.6.6.1 PCR para avaliação da eficiência das extrações

Todas as reações foram realizadas no Laboratório Retrolab da Escola de Veterinária da UFMG. Após as extrações de DNA, todas as amostras foram submetidas à PCR para confirmação da presença do gene da enzima GAPDH (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase) de acordo com Oliveira et al. (2012), para verificar a qualidade da extração e a integridade do DNA obtido. As sequências dos iniciadores utilizados foram: GAPDH F- GGTGATGCTGGTGCTGAGTA e GAPDH R- CCCTGTTGCTGTAGCCAAAT.

A reação foi realizada adicionando os seguintes reagentes num tubo de 0,2mL: 5U de Taq DNA polimerase (Invitrogen Life Technologies®, Brasil); 5,1µL de tampão de PCR 5X, 25mM de MgCl₂, 10mM de dNTP (desoxirribonucleotídeo 5'-trifosfatado- dATP, dCTP, dGTP e dTTP- GE Healthcare), 5pmol de cada oligonucleotídeo (Invitrogen Life Technologies®, Brasil) e 11,84µL de água ultrapura (Sigma). Após a mistura, foram adicionados 2µL de DNA de cada amostra, totalizando um volume final de 25µL.

As reações de PCR foram conduzidas no termociclador convencional Applied Biosystems com incubação inicial a 95°C por 4 minutos, seguida de 35 ciclos, cada um constituindo de desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 54°C por 30 segundos, extensão da polimerase a 72°C por 50 segundos e extensão final a 72°C por 7 minutos. Após os ciclos, os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose a 1,5% em tampão TAE, corado com brometo de etídeo.

4.6.6.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR) para FIV

Para a detecção do FIV foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores senso 5'-CTAGGAGGTGAGGAAGTTCA-3' e anti-senso 5'-CTGCTTGTTGTTCTTGAGTT-3', que amplificam um fragmento alvo de 244pb, dentro da região codificadora do gene *gag* do FIV descrito por Hohdatsu et al. (1992) (Figura 04). Esta técnica foi processada no Retrolab (UFMG).

Iniciador	Sequência do primer (5'-3')	Região	Posição	Fragmento
P-24-1	CTAGGAGGTGAGGAAGTTCA	<i>gag</i> p-24	1119-1138	244pb
P-24-2	CTGCTTGTTGTTCTTGAGTT	<i>gag</i> p-24	1343-1362	

Figura 04 – Sequência de oligonucleotídeos utilizados na amplificação do fragmento de 244 pb do gene *gag* e sua localização no genoma. Adaptado de Hohdatsu et al., 1992.

Após extraído, o DNA foi submetido à PCR de acordo com Hohdatsu et al. (1992), com algumas modificações. Com exceção do DNA, todos os reagentes foram reunidos inicialmente em um mix contendo: 5U de Taq DNA polimerase (Invitrogen Life Technologies®, Brasil), 5,1 µL de tampão de PCR 5X, 25mM de MgCl₂, 10mM de dNTP (desoxirribonucleotídeo 5'-trifosfatado-dATP, dCTP, dGTP e dTTP- GE Healthcare), 5pmol de cada oligonucleotídeo (Invitrogen Life Technologies®, Brasil) e 11,84µL de água ultrapura (Sigma). Após a mistura, foram adicionados 2µL de DNA de cada amostra, totalizando um volume final de 25µL.

As reações de PCR foram conduzidas no termociclador convencional Applied Biosystems com incubação inicial a 94°C por cinco minutos, seguida de 35 ciclos, cada um constituindo de desnaturação a 94°C

por um minuto, anelamento a 55°C por dois minutos, extensão da polimerase a 72°C por dois minutos e extensão final a 72°C por cinco minutos. Após os ciclos, os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose a 1,5% em tampão TAE, corado com brometo de etídeo.

4.6.7 Eletroforese dos produtos da PCR

Foram submetidos à eletroforese (100V e 400ma por 40 minutos) 10µL de cada amostra submetida à PCR em gel de agarose a 1,5% (Ultra Pure™ - Invitrogen) em tampão TAE 1X (20,3mM KH₂PO₄, 10,4mM Tris-acetato, 10mM EDTA ph 8,0), corado com brometo de etídeo (1µL/ml). Em cada corrida foi incluído o padrão de tamanho molecular Ladder 100pb (Invitrogen). Para todas as reações havia um tubo controle de reagentes, sem DNA, controle positivo e negativo. Os géis foram registrados em fotodocumentador L-Pix Loccus Biotecnologia.

4.6.8 Sequenciamento de DNA

4.6.8.1 Purificação do DNA

A purificação do DNA foi precedida utilizando o kit Pure Link™ Quick Gel/Extraction kit (Invitrogen), seguindo criteriosamente o protocolo e recomendações do fabricante. O sequenciamento dos amplicons foi realizada de forma automatizada utilizando-se o sequenciador ABI310 Genetic Analyser com o reagente BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems) segundo os procedimentos operacionais padrão do Laboratório de Genética Animal da Escola de Veterinária da UFMG. A sequência obtida foi avaliada para a determinação de similaridade das sequências de FIV depositadas no banco de genomas, Gen Bank (National Center for Biotechnological Information).

4.6.8.2 Alinhamento das sequências

As sequências foram editadas e alinhadas no Clustal W 1.4 (THOMPSON et al., 1994) no software Bioedit 7.0 (Hall, 1999). Como referência para o alinhamento foram utilizadas sequências dos subtipos A, B, C, D e E da imunodeficiência viral felina disponíveis no GenBank.

4.6.8.3 Análises filogenéticas e rede de haplótipos

Utilizou-se o Software MEGA 5.0 (TAMURA et al., 2011) e modelo evolutivo de Tamura & Nei (1993). A significância dos agrupamentos foi estimada pela análise de *bootstrap* (FELSENSTEIN, 1985). A rede de haplótipos foi construída a partir do programa Network.

4.7 Análise Estatística

Após tabulados e compactados, os dados estão apresentados em forma de tabelas e figuras, conforme a variável observada.

Inicialmente realizou-se teste do qui-quadrado (χ^2) para amostras independentes, visando avaliar possíveis associações entre o teste utilizado e a positividade para FIV.

Para comparação entre as técnicas SNAP Combo plus, PCR e ELISA indireto utilizadas para o diagnóstico do vírus da FIV foi utilizado o teste Exato de Fisher procedendo-se cálculo de sensibilidade e especificidade. E, para avaliar o índice de concordância entre os testes, realizou-se o teste Kappa (κ) verificando-se ainda, o valor preditivo positivo e negativo.

Procedeu-se análise de variância (ANOVA) comparando-se as médias das variáveis hematimétricas (VG, Hemácias, Hemoglobina, CHGM, VGM, Leucócitos, Segmentados, Linfócitos, Monócitos, Eosinófilos, Bastonetes, PPT, Plaquetas) e perfis bioquímicos (Uréia, Creatinina, Fosfatase Alcalina, Albumina, Proteína sérica total, AST e ALT) comparando-se as

médias dos grupos de animais positivos e negativos pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney.

Para verificar possíveis associações entre positividade para FIV e o aumento ou diminuição dos valores hematimétricos e dos perfis bioquímicos realizou-se análise univariada, procedendo-se o Teste Exato de Fisher com cálculo da taxa de risco (OR).

Posteriormente foi realizada à análise de regressão linear para verificar as correlações existentes entre as variáveis hematimétricas e bioquímicas, bem como as possíveis interdependências existentes.

Foi procedida análise univariada, considerando as características do animal (raça, sexo e idade) e as epidemiológicas (origem, local onde vive, contactantes, acesso a rua e vida reprodutiva), utilizando-se o Teste Exato de Fisher, calculando-se ainda a taxa de risco (OR).

As análises foram realizadas utilizando o pacote estatístico GraphPad InStat versão 3.05.

Todas as análises estatísticas foram realizadas considerando-se um nível de significância mínima de 5% ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este estudo trata-se do primeiro relato da ocorrência de FIV e FeLV em São Luís – MA, tendo sido analisadas 120 amostras, das quais 38,3% (46/120) eram de felinos domiciliados, 28,3% (34/120) de animais atendidos no HVU/CCA/UEMA, 9,2% (11/120) oriundos de clínicas particulares do município, 10,0% (12/120) de abrigos de animais e 14,17% (17/120) consistiram em animais errantes do Campus da UEMA (Tabela 01). Destes, 52,5% (63/120) eram fêmeas e 47,5% (57/120) machos, com idade oscilando entre um a 13 anos (Figura 05).

Tabela 01 – Distribuição percentual das amostras de felinos, provenientes do município de São Luís – MA, segundo a origem dos animais. São Luís, 2014

Origem dos animais	Positivos
Felinos domiciliados	38,33 (46/120)
HVU/CCA/UEMA	28,33 (34/120)
Clínicas particulares	9,17 (11/120)
Abrigo de animais	10,00 (12/120)
Animais errantes do Campus da UEMA	14,17 (17/120)
Total	100,00 (120/120)

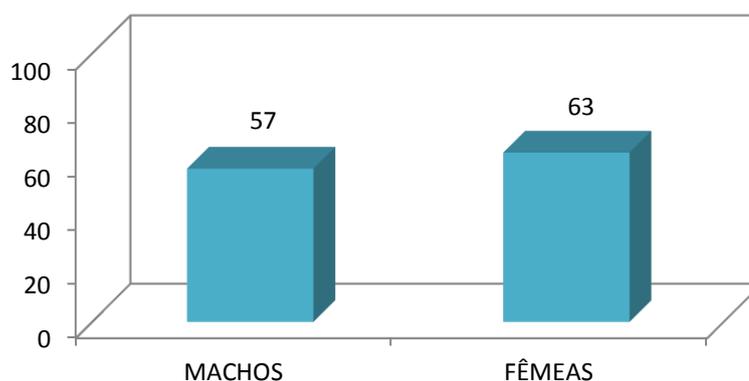


Figura 05 – Distribuição percentual das amostras de felinos, provenientes do município de São Luís – MA, segundo o sexo dos animais. São Luís, 2014.

Todas as amostras foram testadas com os oligonucleotídeos GAPDH-F e GAPDH-R que amplificam uma parte do gene da enzima

gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase e apresentaram uma banda de 709pb demonstrando êxito nas ampliações de DNA (Figura 06).

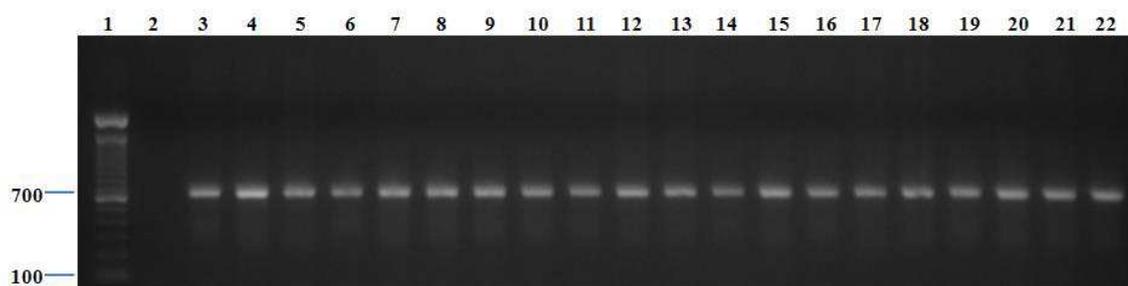


Figura 06 – Registro digital da corrida eletroforética em gel de agarose (1,5% em tampão TAE, corado com brometo de etídeo a 0,01%) da PCR para a detecção de porção do gene GAPDH cujo produto possui 709pb. Presença de DNA amplificável nas amostras utilizadas.

- 1 - Marcador de tamanho molecular 100pb;
- 2 - Controle negativo – água ultrapura;
- 3 a 22 - amostras positivas para o gene.

Obteve-se 18,33% (22/120) de positividade para FIV considerando todos os testes utilizados, 10,83% (13/120) para PCR, 9,17% (11/120) no SNAP combo plus e 10,83% (13/120) ao proceder-se o teste de ELISA indireto, verificando-se ao Teste do qui-quadrado (χ^2), não existir associação significativa ($p > 0,05$) entre teste diagnóstico utilizado e a positividade para FIV (Tabela 02). Para FeLV, obteve-se nas 120 amostras, apenas 0,83% (1/120) de amostras positivas no SNAP combo plus. Este único animal positivo para FeLV não apresentou positividade para FIV em nenhum dos três testes.

Tabela 02 – Distribuição percentual das amostras de felinos, provenientes do município de São Luís – MA, segundo o teste utilizado para detecção de FIV e a positividade para o vírus da FIV. São Luís, 2014

Testes utilizados	Positivos (%)	Negativos (%)
PCR	10,83 ^a (13/120)	89,17 (107/120)
ELISA INDIRETO	10,83 ^a (13/120)	89,17 (107/120)
SNAP COMBO PLUS	9,17 ^a (11/120)	90,83(109/120)
Total	18,33 (22/120)	81,67 (98/120)

a – letras iguais na coluna indicam não haver associações significativas ($p > 0,05$) entre os testes utilizados e a positividade para FIV. Teste do qui-quadrado (χ^2) para amostras independentes.

$\chi^2 = 0,8865$; $p = 0,2410$.

O presente estudo apresentou um maior percentual de positividade na técnica da PCR quando comparado à Marçola et al. (2013), que observaram 2% (4/200) de animais positivos para FIV no Distrito Federal (GO) e às pesquisas realizadas por Caxito et al. (2006), Teixeira et al. (2007) e Alves et al. (2011), na cidade de Belo Horizonte (MG) apresentando valores de 2,7% (12/450), 4,14% (6/145) e 6,41% (5/78), de positividade, respectivamente.

Entretanto, os valores observados em São Luís (MA) foram abaixo dos relatados por Lara et al. (2008), que demonstraram uma ocorrência de 14,8% (67/454) de felinos oriundos de 13 cidades do estado de São Paulo, por Souza et al. (2002), que no município do Rio de Janeiro (RJ), verificaram 20,2% de positividade e, ainda, menores que os dados de Caldas et al. (2000), que encontraram 37,5% (15/40) de animais reagentes, no estado do Rio Grande do Sul, demonstrando alta ocorrência, porém, neste último, se selecionou apenas animais com suspeita clínica para FIV, o que pode levar a uma elevação nos resultados.

Resultados divergentes podem estar relacionados às técnicas utilizadas, origem das amostras, número de amostras estudadas, estilo de vida a qual estão submetidos os animais, tipo e virulência da cepa.

A *nested* PCR é um método sensível de PCR no qual o produto amplificado é submetido a um segundo processo de amplificação, utilizando um conjunto de iniciadores homólogos a sequências internas do segmento amplificado anteriormente. Este procedimento torna a reação de PCR mais específica. Em 1992 foram descritos os primeiros ensaios utilizando a *nested* PCR para detecção do provírus do FIV, e, a partir destes estudos, se observou que os linfócitos FIV infectados estão presentes em uma frequência muito baixa no sangue periférico (RIMSTAD & UELAND, 1992; HOHDATSU et al., 1992).

Talvez o uso da técnica *nested* PCR pudesse ter aumentado o número de amostras positivas, comparativamente à utilização da PCR convencional.

A soroprevalência observada em gatos doentes é maior que em gatos saudáveis, sendo um indicador indireto de potencial de

indução de doenças do vírus da FIV (LUTZ, 1990; O'CONNOR et al., 1991; PEDERSON et al., 1991; BANDECCHI et al., 1992). Uma alta soroprevalência pode ser consequência de resultados falso-negativos em testes sorológicos, por isto, justifica-se realizar pelo menos dois tipos de testes para poder se afirmar que um gato é realmente portador do FIV.

Na Ásia, um estudo realizado em Istambul, Turquia, se estimou 22,3% de gatos positivos para o FIV (YILMAZ et al., 2000). Em Taiwan, Japão, a prevalência foi de 4% para FIV na pesquisa realizada por LIN et al. (1995). E ainda no mesmo país, Thomas & Robinson (1993) observaram incidência da infecção por FIV em 6,3% de gatos doentes e 5,2% entre animais saudáveis.

Na África, na Tunísia, constatou-se prevalência de 20,5% para o FIV. Na Austrália, em Sidney, a prevalência da infecção por FIV variou de 6,5% a 7,5% entre gatos saudáveis e 20,8% nos animais doentes, como descrito por Malik et al. (1997).

Estudo realizado na Europa e nos Estados Unidos com 52.597 gatos doentes, demonstrou maior prevalência na França (24.621 amostras) para o vírus da FIV, onde 15,4% (3.791/24.621) dos gatos testados foram positivos para FIV e 4,3% (1.058/24.621) para FIV e FeLV, e, nos Estados Unidos, de 27.976 gatos testados, 7,4% (2.070/27.976) foram positivos para o FIV e 1,5% (420/27.976) para ambas as viroses, sendo este último inferior ao encontrado na presente pesquisa. (BRALEY, 1994).

Segundo Gómez et al. (1999) na Argentina, foram testados 300 gatos, sendo 44% positivos para o vírus da FIV.

No Rio de Janeiro, levantamentos sorológicos determinaram 16,7% de felinos portadores do vírus, entre animais doentes e contactantes, realizado por Souza et al. (2002) e 21,0% por Almeida et al. (2004).

Pesquisa realizada por Reche Jr et al. (1997) demonstrou 11,7% (47/401) de positividade na sorologia para FIV e 7,98% (32/401) para FeLV, utilizando para a pesquisa, 123 animais sadios e 278 doentes.

Os valores de sorologia positiva para o vírus da FIV observados no município de São Luís (MA) foram menores que os verificados nos trabalhos de Thomas & Robinson (1993), Braley (1994), Malik et al. (1997),

Gómez et al. (1999) e Yilmaz et al. (2000) em outros países, bem como, os de Reche Jr et al. (1997), Souza al. (2002) e Almeida et al. (2004) desenvolvidos no Brasil.

Em Minas Gerais, Teixeira et al. (2007), observaram 32,5% (13/40) de positividade para FeLV, discordando em muito, do valor observado em São Luís (MA), onde se verificou apenas 0,83% (1/120) de animais reagentes, conforme já descrito, sendo também inferior aos achados de Reche Jr et al. (1997) com 7,98% (32/401).

O único teste utilizado para diagnóstico de FeLV neste experimento foi o Elisa Snap combo FIV/FeLV que detecta a proteína p27 do capsídeo, sendo o mais usado na rotina da clínica veterinária. Porém, o mesmo não é capaz de identificar animais com infecção latente, quando não há transcrição viral e indica viremia 28 dias após infecção. Por sua vez, a PCR é capaz de detectar até uma cópia do provírus apenas uma semana após a infecção (TANDON et al., 2005). Talvez alguns animais apresentassem infecção latente na medula óssea, não sendo então diagnosticados pelo método utilizado.

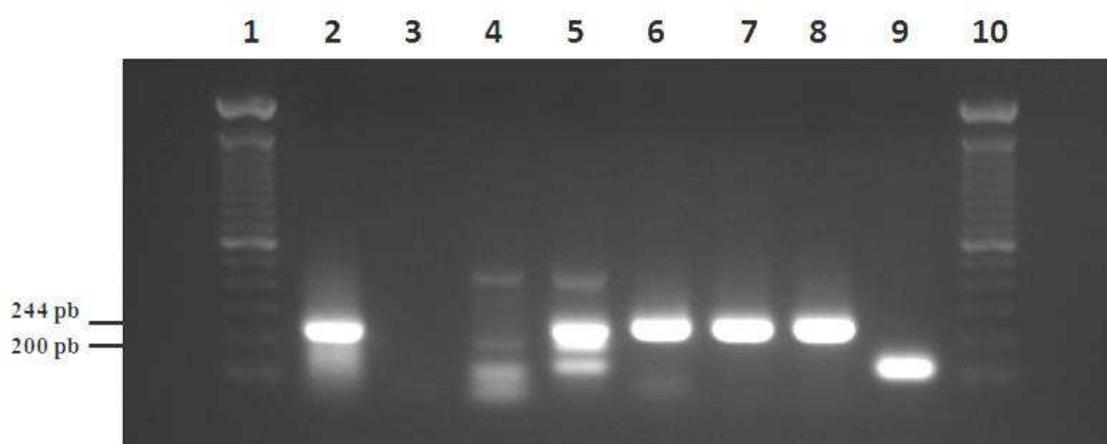


Figura 07 - Registro digital da corrida eletroforética em gel de agarose (1,5% em tampão TAE, corado com brometo de etídeo a 0,01%) da PCR para a detecção do gene *gag*, cujo produto possui 244pb.

1 e 10 - marcador de tamanho molecular 100pb;

2 - Controle positivo;

3 - Controle negativo;

4 e 9 - amostras negativas;

5, 6, 7 e 8 - amostras positivas.

Na Figura 07 podem-se observar alguns resultados das reações de PCR com produtos de 244pb, conforme o local de anelamento destes oligonucleotídeos no gene *gag* do vírus da FIV, segundo descrito por Hohdatsu et al. (1992).

Analisando-se os exames sorológicos e moleculares, verificaram-se divergências de 18 amostras entre os testes utilizados (Tabela 03). Alves et al. (2010) também encontraram resultados semelhantes em 17 amostras com resultados conflitantes utilizando três testes sorológicos (SNAP Combo Plus, Elisa indireto, *Western blot*) e a PCR.

Tabela 03 – Distribuição das amostras de felinos, provenientes do município de São Luís – MA, segundo o teste utilizado para detecção de FIV e a positividade para o vírus da FIV. São Luís, 2014

Amostras	PCR	ELISA INDIRETO	SNAP COMBO PLUS
13	-	+	+
23	+	+	+
24	-	+	-
27	-	+	+
40	+	-	-
41	+	-	-
44	+	-	-
47	-	+	-
51	+	-	-
52	-	+	-
63	+	-	-
67	-	-	+
68	-	+	+
69	+	-	-
74	+	+	+
79	+	+	+
82	+	-	+
90	+	-	+
91	-	+	+
92	-	+	-
93	+	-	-
117	+	+	+
Total	10,83 (13/120)	10,83 (13/120)	9,17 (11/120)

O teste ELISA pode detectar anticorpos contra a proteína p24 ou contra a proteína transmembrana gp41, sendo esta última, o antígeno de escolha para usar no teste (HARTMANN, 1998; CALZOLARI et al., 1995).

Os antígenos usados na técnica de ELISA podem ser derivados de culturas de células, de partículas virais purificadas e de proteínas recombinantes p24 e p15 do capsídeo (CALZOLARI et al., 1995; SIBILLE et al., 1995).

Já foi demonstrado, em retrovírus, que proteínas transmembranas apresentam maior imunogenicidade que as proteínas do capsídeo (CHONG et al., 1991; FONTENOT et al., 1992). Entretanto, CA é a proteína majoritária do capsídeo viral, altamente conservada e não glicosilada. Estes fatores indicam CA como uma das proteínas de eleição para uso na prova de ELISA (CALZOLARI et al., 1995; MERMER et al., 1992; REID et al., 1991).

Resultados discordantes na detecção sorológica podem decorrer da evolução da infecção ou de reações cruzadas. Após a infecção, os anticorpos circulantes aparecem entre duas a quatro semanas, sendo detectáveis por toda a vida do animal. Caso os testes para detecção de anticorpos sejam realizados neste período, pode-se obter resultado falso-negativo. Filhotes devem ser testados preferencialmente após os seis meses de idade, para evitar a interferência de anticorpos maternos (CANEY, 2000).

A maioria dos felinos FIV infectados desenvolvem anticorpos anti-FIV 60 dias após a infecção, no entanto, o tempo necessário para a soroconversão é extremamente variável e pode ser considerado maior que 60 dias. Alguns gatos não realizam soroconversão, não sendo identificados por testes sorológicos. Quando houver dúvidas quanto ao resultado deve-se fazer um teste mais específico como *Western blot*.

A detecção do provírus em células sanguíneas por PCR também pode ser realizada, utilizando-se o DNA extraído dos leucócitos, constituindo uma importante ferramenta para o diagnóstico do FIV. No entanto, a PCR pode apresentar falhas na detecção de vírus com variações genômicas (BACHMANN, MATHIASON-DUBARD et al., 1997; CAXITO, 2003; RAVAZZOLLO e COSTA, 2007) e a quantidade de vírus no sangue é pequena

durante a fase assintomática da doença quando grande parte dos exames é realizada (PEDERSEN, YAMAMOTO et al., 1989).

Observando-se a distribuição das amostras positivas para FIV segundo a quantidade de testes utilizados, verifica-se que 54,55% (12/22) foram positivos em apenas um teste, 27,27% (6/22) em dois e 18,18% (4/22) em três (Tabela 04) indicando variações de sensibilidade e especificidade entre estes.

Tabela 04 – Distribuição das amostras de felinos, provenientes do município de São Luís – MA, segundo a quantidade de testes com positividade para o vírus da FIV. São Luís, 2014

Quantidade de testes	Positivos
1	54,55 (12/22)
2	27,27 (6/22)
3	18,18 (4/22)
Total	100,00 (22/22)

O teste que apresentou maior sensibilidade, equivalente a 72,73% e com especificidade de 95,41% foi o SNAP combo plus com teste kappa de 0,63%, e o com maior especificidade igual a 97,20% e com sensibilidade de 61,54% foi o ELISA indireto, também com o teste kappa de 0,63%, demonstrando boa concordância entre os testes (Tabela 05).

Comparativamente, SNAP combo plus apresentou melhor sensibilidade, enquanto que ELISA indireto e PCR tiveram, similarmente, melhor especificidade ($p < 0,05$). A pequena diferença de especificidade entre os testes (todos acima de 90%) indica que os mesmos são bastante específicos e com VPN alto, podendo-se inferir que ambos tem capacidade de distinguir os verdadeiramente negativos.

Neste caso, dos testes utilizados na pesquisa, o que apresentou a melhor eficácia foi o SNAP por ser um teste rápido e de especificidade semelhante aos outros, com sensibilidade maior, e, detectando os verdadeiramente positivos ($p < 0,05$).

O SNAP Combo Plus é um teste comercial imunocromatográfico sensibilizado com os antígenos recombinantes p24 e gp40 do FIV e anticorpo monoclonal anti-proteína p27 do FeLV o que justifica sua alta sensibilidade e especificidade (HARTMANN et al., 2007).

O SNAP é um teste qualitativo e a vantagem da técnica de ELISA em placa é a possibilidade da análise da absorbância de amostras individuais, além do fato que as de perfil duvidoso podem ser confirmadas por um teste mais específico (ALVES et al., 2010).

Imunoensaios dos mais diferentes tipos são bastante utilizados na prática laboratorial. Alguns testes oferecem a vantagem de rapidez e conveniência, entretanto informações sobre sua eficácia é limitada e muitas vezes conflitante (PINCHES et al., 2007). Testes de sensibilidade e especificidade nos EUA demonstram que há grande variação nos resultados dos testes comerciais, nos quais a sensibilidade varia de 41% a 93% e a especificidade de 44% a 100% (LEVY et al., 2008).

Diferenças entre os testes podem ser explicadas pelo fato de amostras amplificadas na PCR e com resultados negativos na sorologia, podem ser de animais que tenham pouca quantidade de anticorpos frente à infecção pelo FIV. E, os soropositivos que não amplificam na PCR podem ser explicados pela baixa quantidade de material genético, o que, poderia justificar a utilização de uma *nested* PCR, aumentando, desta forma, a sensibilidade e especificidade dos testes.

A importância da utilização da técnica de PCR em medicina veterinária pode ser associada a situações específicas em que não seja possível detectar anticorpos induzidos pela infecção. Com relação ao FIV, já foi demonstrado que animais soronegativos podem reagir positivamente à detecção do DNA proviral (CALDAS et al., 2000).

A soroconversão acontece de duas a quatro semanas após a exposição ao vírus, de acordo com Yamamoto et al. (1988). A presença de anticorpos anti-FIV correlaciona-se com a infecção persistente por FIV (Yamamoto et al., 1989). Contudo, Hopper et al. (1989) demonstraram que

15% dos felinos vírus positivos, geralmente com três a quatro anos pós-infecção para o vírus da FIV são sorologicamente negativos.

No entanto, quando a célula hospedeira integra o provírus, mas não produz novas cópias virais, infecção latente pode estar presente, podendo ser quebrada com ativação dessa mesma célula. Esta representa um reservatório não susceptível à ação dos anticorpos neutralizantes, o que constitui um obstáculo à vacinação. Dessa forma, alguns animais poderão ter o provírus, sem, contudo, apresentar anticorpos. Não obstante, deve-se levar em consideração que gatos expostos a baixas doses do vírus podem ter uma soroconversão tardia.

Dentre os sinais clínicos mais comumente observados ao exame clínico dos animais positivos para FIV verificaram-se gengivites, estomatites ou gengivoestomatites, alterações dermatológicas, oftálmicas, respiratórias e genitourinárias, além de caquexia, desidratação, linfadenopatia, diarreia e febre (Tabela 06; Figuras 08 e 09).

Tabela 06 – Distribuição percentual das amostras de felinos, provenientes do município de São Luís – MA, segundo a presença de sinais clínicos e a positividade para o vírus da FIV. São Luís, 2014

Sinal Clínico	Positivos	Negativos	Total
Alterações dermatológicas	54,55 (12/22)	35,71 (35/98)	39,17 (47/120)
Gengivite ou gengivoestomatite	18,18 (4/22)	1,02 (1/98)	4,17 (5/120)
Alterações oftálmicas	18,18 (4/22)	3,06 (3/98)	5,83 (7/120)
Alterações respiratórias	13,63 (3/22)	1,02 (1/98)	3,33 (4/120)
Caquexia	13,63 (3/22)	1,02 (1/98)	3,33 (4/120)
Desidratação	9,09 (2/22)	6,12 (6/98)	6,67 (8/120)
Linfadenopatia	9,09 (2/22)	1,02 (1/98)	2,50 (3/120)
Alterações genitourinárias	4,55 (1/22)	2,04 (2/98)	2,50 (3/120)
Diarréia	4,55 (1/22)	1,02 (1/98)	1,67 (2/120)
Febre	4,55 (1/22)	2,04 (2/98)	2,50 (3/120)
Trombocitopenia	45,46 (10/22)	57,14 (56/98)	55,00 (66/120)

Dos animais positivos para FIV, apenas dois não apresentaram alterações clínicas. Zanutto et al. (2011) estudando a fase aguda da infecção por FIV em felinos experimentalmente infectados, não encontraram alterações do apetite, perda de peso, distúrbios digestivos, respiratórios ou neurológicos. Os sinais encontrados pelos autores foram picos febris ocasionais (39,6 - 40°C)

na terceira semana pós-infecção, aumento progressivo de linfonodos periféricos, sendo mais evidentes na região cervical, além de uveíte anterior na quinta semana pós-infecção.



Figura 08 - Registro digital de felinos, provenientes do município de São Luís – MA, com presença de sinais clínicos encontrados em animais positivos para o FIV.

- A - uveíte;
- B - quemose e conjuntivite;
- C - úlcera de córnea;
- D - esporotricose;
- E - secreção nasal serosanguinolenta;
- F - caquexia.

Em São Luís, observou-se apenas um animal com uveíte e outro apresentando febre recorrente. Deve-se considerar que Zanutto et al. (2011) estudando a fase aguda da infecção, observaram sinais inespecíficos para a doença, por isso os sinais clínicos encontrados no presente estudo podem estar relacionados ou não, dependendo da fase de infecção da enfermidade. Os animais podem estar numa das cinco fases da doença, como descrito por Arjona et al. (2007) e os sinais clínicos estariam relacionados com o vírus ou então com outros agentes devido à imunossupressão, provocada pelo mesmo.

Teixeira et al. (2005) estudando animais de abrigo demonstraram que 77,8% (7/9) soropositivos para FIV apresentavam alterações clínicas,

caracterizadas por perda de peso, dermatopatias, desidratação, alterações respiratórias, cistite e estomatite. Os achados no município de São Luís apresentam similaridades com a 90,9% (20/22) dos positivos apresentavam algum tipo de alteração clínica.



Figura 09 - Registro digital de felinos, provenientes do município de São Luís – MA, com alterações da cavidade oral observadas nos animais positivos para o FIV.

- A - Gingivite moderada;
- B - Gengivoestomatite;
- C - Gingivite;
- D - Estomatite.

Entre os achados clínicos mais comuns em gatos infectados estão gengivite, estomatite e periodontite. As lesões podem ser ulcerativas e/ou proliferativas e consistem em infiltrados plasmocitários e linfocíticos que podem se estender aos linfonodos regionais e ao baço. Os animais com inflamação oral têm maior probabilidade de disseminar o vírus na saliva do que os animais

assintomáticos (JOHNSON, 2005). No presente estudo, verificou-se 18,18% (4/22) de animais positivos que apresentavam estes tipos de lesões.

Os sinais clínicos associados à FIV podem surgir como resultado direto da infecção viral ou como consequência da síndrome da imunodeficiência que se associa a mesma. Informações a respeito da sintomatologia têm surgido pela observação de casos clínicos e de estudos experimentais da infecção pelo vírus da FIV. Muitas vezes os animais doentes possuem históricos de enfermidade crônica.

Frequentemente, parece começar com episódios de enfermidades esporádicas ou recorrentes, que são quase sempre são intercalados com períodos de normalidade clínica. A maioria dos animais que apresentavam doenças recorrentes na presente pesquisa, estavam acometidos por algum tipo de doença associada, além da FIV.

Alguns gatos têm demonstrado rápido avanço dos sinais clínicos enquanto outros têm apresentado pouca indicação de piora na condição clínica, mesmo em períodos prolongados. Entretanto, na maioria dos gatos, à medida que a doença progride, os sinais clínicos se tornam mais graves e evidentes.

Dois animais apresentavam caquexia, com doença renal crônica e severa anemia, sem melhora dos sinais clínicos. Segundo Chandler et al. (2006), em casos mais avançados os sinais podem acometer vários órgãos e os gatos podem ficar bastante debilitados, de tal forma que ocorra morte ou se exija eutanásia.

Como os sinais clínicos surgem, em grande parte, de doenças secundárias ou infecções oportunistas, nenhum deles é, de qualquer maneira, diagnóstico de infecção por FIV. Todavia, deve-se suspeitar de infecções por FIV subjacente em gatos com histórico de enfermidade crônica, com sinais clínicos graves e inexplicados, indivíduos que não respondam a medidas terapêuticas ou que apresentem combinação de vários sinais clínicos (CHANDLER et al., 2006).

Na avaliação dos esfregaços sanguíneos, 9,09% (2/22) dos gatos FIV positivos e 6,12% (6/98) dos negativos apresentaram eritrócitos infectados

pelo *Mycoplasma haemofelis* (Tabela 07). As infecções concomitantes por hemoplasmas podem constituir uma causa de anemia em gatos FIV positivos. Possivelmente a anemia encontrada na avaliação laboratorial dos gatos que apresentavam micoplasmose, seja por conta deste hemoplasma. Este pode ser devido à imunossupressão que a infecção pelo vírus da FIV promove facilitando a ação de agentes oportunistas. Rivetti júnior et al. (2006), encontraram em gatos errantes 17,7% (8/45) de animais com eritrócitos infectados pelo *M. haemofelis*.

Tabela 07 – Distribuição das amostras de felinos, provenientes do município de São Luís – MA, segundo a presença de co-infecções e a positividade para o vírus da FIV. São Luís, 2014

Co-infecções	Positivos	Negativos	Total
FELV	0,00 (0/22)	1,02 (1/98)	0,83 (1/120)
<i>Mycoplasma haemofelis</i>	9,09 (2/22)	6,12 (6/98)	6,67 (8/120)
<i>Lynxacarus radovskyi</i>	54,55 (12/22)	35,71 (35/98)	39,17 (47/120)
<i>Babesia</i> spp.	0,00 (0/22)	2,04 (2/98)	1,67 (2/120)
<i>Sporothrix schenckii</i>	4,55 (1/22)	0,00 (0/98)	0,83 (1/120)
<i>Ehrlichia</i> spp.	9,09 (2/22)	3,06 (3/98)	4,17 (5/120)

Os resultados dos valores hematimétricos foram avaliados com a finalidade de verificar possíveis diferenças de animais positivos e negativos para FIV, não havendo, entretanto, diferenças estatísticas significativas ($p > 0,05$) (Tabela 08).

Alterações hematológicas e citopenias de sangue periférico, tais como anemia, neutropenia, linfopenia e trombocitopenia são frequentemente encontradas em gatos com FIV, entretanto as causas que levam às citopenias de múltiplas linhagens ainda não estão bem elucidadas (FUGINO et al., 2008).

A dificuldade em avaliar as consequências hematológicas na infecção por FIV decorrem da alta prevalência de co-infecções, entre elas com FeLV (SHELTON et al., 1990). Parece que fatores associados com a imunodeficiência progressiva, como o aumento da carga parasitária, infecções concomitantes e desnutrição tenham um papel fundamental na patogênese e nas anormalidades hematológicas que surgem durante o estágio sintomático da infecção (LINENBERGER et al., 1998).

Tabela 09 – Distribuição das amostras de felinos, provenientes do município de São Luís – MA, segundo os parâmetros hematimétricos e a positividade para o vírus da FIV. São Luís, 2014

Parâmetro Hematimétrico		FIV		p	Odds Ratio
		+	-		
VG	Abaixo ^{ns}	2	12	1,00	0,71
	Normal	20	85	-	-
	Acima ^{ns}	0	1	1,00	1,39
Hemácias	Abaixo ^{ns}	11	46	0,82	1,13
	Normal	11	52	-	-
	Acima ^{na}	0	0	-	-
Hemoglobina	Abaixo ^{ns}	2	11	1,00	0,77
	Normal	20	85	-	-
	Acima ^{ns}	0	2	1,00	0,83
VCM	Abaixo ^{ns}	0	1	1,00	1,44
	Normal	22	97	-	-
	Acima ^{na}	0	0	-	-
CHCM	Abaixo ^{na}	0	0	-	-
	Normal	22	98	-	-
	Acima ^{na}	0	0	-	-
Leucócitos	Abaixo ^{ns}	4	24	0,59	0,67
	Normal	18	72	-	-
	Acima ^{ns}	0	2	1,00	0,78
Segmentados	Abaixo ^{ns}	3	19	0,76	0,62
	Normal	19	75	-	-
	Acima ^{ns}	0	4	1,00	0,43
Linfócitos	Abaixo ^{ns}	6	42	0,23	0,52
	Normal	15	55	-	-
	Acima ^{ns}	1	1	0,40	3,67
Monócitos	Abaixo ^{na}	0	0	-	-
	Normal	22	97	-	-
	Acima ^{ns}	0	1	1,00	1,44
Eosinófilos	Abaixo ^{na}	0	0	-	-
	Normal	16	84	-	-
	Acima ^{ns}	6	14	0,20	2,25
Bastonetes	Abaixo ^{na}	0	0	-	-
	Normal	19	93	-	-
	Acima ^{ns}	3	5	0,16	2,94
PPT	Abaixo ^{ns}	5	23	1,00	0,96
	Normal	17	75	-	-
	Acima ^{na}	0	0	-	-
Plaquetas	Abaixo ^{ns}	10	56	0,23	0,55
	Normal	11	34	-	-
	Acima ^{ns}	1	8	0,67	0,39

Análise uni-variada de associação entre valores abaixo e acima, em relação aos normais, de cada variável e positividade para FIV, utilizando-se o Teste Exato de Fisher com cálculo da taxa de risco (OR).

ns – não existe associação significativa ($p > 0,05$);

na – não analisável estatisticamente.

VG – volume globular; VCM – volume corpuscular médio; CHCM – concentração de hemoglobina corpuscular média; PPT – proteínas plasmáticas totais.

Apesar de não se ter observado associações significativas ($p > 0,05$) entre os valores acima e abaixo, em relação aos normais, de cada parâmetro hematimétrico e a positividade para FIV (Tabela 09), grande parte dos felinos apresentavam resultados abaixo dos valores de referência, provavelmente porque, tanto positivos quanto negativos, em sua maioria, demonstravam algum tipo de alteração clínica, relacionada ou não com o FIV, além do fato que 61,67% (74/120) eram animais oriundos de atendimentos do HVU/CCA/UEMA, clínicas particulares, abrigos de animais ou animais errantes do Campus da UEMA.

Embora, as anemias severas sejam menos comuns nos gatos FIV positivos, quando comparados com os gatos FeLV positivos, pode existir uma anemia leve a moderada não-regenerativa, a partir de doença inflamatória e diminuição da função da medula óssea secundária a infecção viral, apesar do mecanismo ainda ser pouco claro (FUJINO et al., 2008). Muitos gatos FIV positivos são geriátricos e a presença de doença renal crônica concomitante pode igualmente contribuir para anemia.

Os resultados dos valores bioquímicos foram avaliados com a finalidade de verificar possíveis diferenças de animais positivos e negativos para FIV, não havendo, entretanto, diferenças estatísticas ($p > 0,05$) exceto para fosfatase alcalina onde se observou diferença estatística significativa ($p < 0,01$) entre a média de positivos ($54,68 \pm 12,47$ UI/L) e a de negativos ($37,03 \pm 12,67$ UI/L) (Tabela 10), apesar da maioria dos animais estarem dentro dos valores de referência (25 a 93 UI/L).

Rodrigues et al. (2007) estudando a fase aguda da infecção pelo vírus da FIV, verificaram aumento significativo de gamaglobulinas aos quatro meses pós infecção e que a concentração sérica de albumina manteve-se significativamente menor em relação aos felinos não infectados. No presente trabalho proteínas totais e albumina mantiveram-se inalteradas, apesar de que alguns animais positivos apresentavam aumento desses perfis bioquímicos.

Tabela 11 – Distribuição das amostras de felinos, provenientes do município de São Luís – MA, segundo os parâmetros bioquímicos sanguíneos e a positividade para o vírus da FIV. São Luís, 2014

Parâmetro Bioquímico Sanguíneo		FIV		p	Odds Ratio
		+	-		
Uréia	Abaixo ^{ns}	11	48	1,00	1,15
	Normal	08	40	-	-
	Acima ^{ns}	03	10	0,69	1,50
Creatinina	Abaixo ^{ns}	02	02	0,09	8,00
	Normal	05	40	-	-
	Acima ^{ns}	15	56	0,21	2,14
Proteína Total no Soro	Abaixo ^{ns}	01	13	0,45	0,34
	Normal	14	61	-	-
	Acima ^{ns}	07	24	0,40	0,26
Albumina	Abaixo ^{ns}	01	03	0,56	1,53
	Normal	19	87	-	-
	Acima ^{ns}	02	08	1,00	1,15
Fosfatase Alcalina	Abaixo ^{ns}	00	03	1,00	0,61
	Normal	22	95	-	-
	Acima ^{na}	00	00	-	-
AST	Abaixo ^{ns}	02	14	1,00	1,29
	Normal	02	18	-	-
	Acima ^{ns}	03	05	0,12	5,40
ALT	Abaixo ^{ns}	00	02	1,00	1,18
	Normal	05	32	-	-
	Acima ^{ns}	02	03	0,19	4,27

Análise uni-variada de associação entre valores abaixo e acima, em relação aos normais, de cada variável e positividade para FIV, utilizando-se o Teste Exato de Fisher com cálculo da taxa de risco (OR).

ns – não existe associação significativa ($p > 0,05$);

na – não analisável estatisticamente.

AST – Aspartato Amino Transferase; ALT – Alanina Amino Transferase.

Apesar de não se ter observado associações significativas ($p > 0,05$) entre os valores acima e abaixo, em relação aos normais, de cada parâmetro bioquímico e a positividade para FIV (Tabela 11), muitos resultados estavam abaixo ou acima dos valores de referência, provavelmente pelo mesmo fato já ressaltado para os dados hematimétricos, que pode estar relacionado a algum tipo de alteração clínica ou origem dos animais.

Ao se proceder o teste de correlação entre as variáveis estudadas, verificou-se que diversas variáveis hematimétricas e bioquímicas não apresentaram correlação entre si ($p > 0,05$), excetuando-se apenas plaquetas x albumina, proteína plasmática total x proteína plasmática, leucócitos totais x plaquetas e leucócitos totais x linfócitos, que estavam

parcialmente correlacionadas ($p > 0,05$), porém com coeficientes de correlação e determinação muito baixos.

Desta forma, pode-se inferir que as alterações hematimétricas e bioquímicas observadas não são dependentes entre si ($p > 0,05$) e as correlações verificadas estão relacionadas a outros fatores e não a infecção pelo vírus da FIV.

A análise univariada de associação entre as características do animal (raça, sexo e idade) e positividade para FIV, revelou associações significativas entre animais positivos e as variáveis sexo ($p < 0,05$) e idade ($p < 0,01$) (Tabela 12).

Tabela 12 – Distribuição das amostras de felinos, provenientes do município de São Luís – MA, segundo as características do animal e a positividade para o vírus da FIV. São Luís, 2014

Característica		FIV				p	Odds Ratio
		POSITIVO		NEGATIVO			
		n	%	n	%		
Raça	SRD	21	17,50	85	70,83	0,4619 ^{ns}	3,212
	RP	01	0,83	13	10,83		
Sexo	Macho	15	12,50	42	35,00	0,0361*	2,857
	Fêmea	07	5,83	56	46,67		
Idade (meses)	< 36	11	9,17	81	67,50	0,0037**	4,765
	≥ 36	11	9,17	17	14,17		

Análise univariada de associação entre variáveis do animal e positividade para FIV, utilizando-se o teste Exato de Fisher com cálculo da taxa de risco (OR).

ns – não existe associação significativa ($p > 0,05$);

* – significativo ($p < 0,05$);

** – muito significativo ($p < 0,01$).

SRD: sem raça definida; RP: raça pura (angorá, siamês, persa).

Os resultados demonstram que a possibilidade de infecção é maior nos machos 12,5% (15/120) do que nas fêmeas 5,83% (07/120), e na variável idade, com maior percentual 39,29% (11/28) de positividade para FIV em animais acima de três anos, quando comparados aos 11,96% (11/92) de positivos com idade abaixo de três anos. Assim, considera-se que animais machos e acima de três anos de idade (ORs = 2,857 e 4,765, respectivamente) tem maior risco de apresentar a doença.

Para a variável raça não se observou associação estatística significativa ($p > 0,05$) com a positividade para FIV, com percentual maior em animais sem raça definida, no entanto, há que se considerar, que a maioria dos animais eram sem raça definida.

Sobrinho et al. (2011) verificaram maior frequência da positividade para FIV em machos em relação às fêmeas e em gatos com faixa etária entre um e três anos de idade e quanto à distribuição racial houve maior frequência em animais sem raça definida do que naqueles da raça siamês.

Segundo Reche Jr et al. (1997) a infecção pelo FIV é mais frequente entre os machos, quando comparada às fêmeas, na proporção de 4:1, não se observando, entretanto, diferença entre machos e fêmeas infectados em relação a FeLV.

Tabela 13 – Distribuição das amostras de felinos, provenientes do município de São Luís – MA, segundo as características epidemiológicas e a positividade para o vírus da FIV. São Luís, 2014

Característica		FIV				p	Odds Ratio
		POSITIVO		NEGATIVO			
		n	%	n	%		
Origem como errante ¹	Sim	18	15,00	86	71,67	0,4906 ^{ns}	0,628
	Não	04	3,33	12	10,00		
Mantido como errante ²	Sim	03	2,50	14	11,67	1,0000 ^{ns}	0,947
	Não	19	15,83	84	70,00		
Contactantes ³	Sim	21	17,50	67	55,83	0,0075 ^{**}	9,716
	Não	01	0,83	31	25,83		
Acesso à rua	Sim	20	16,67	87	72,50	1,0000 ^{ns}	1,264
	Não	02	1,67	11	9,17		
Vida reprodutiva	Sim	18	15,00	65	54,17	0,2045 ^{ns}	2,285
	Não	04	3,33	33	27,50		

Análise univariada de associação entre variáveis epidemiológicas e positividade para FIV, utilizando-se o Teste Exato de Fisher com cálculo da taxa de risco (OR).

1 - sim: rua; não: domicílio, gatil, pet shop;

2 - sim: campus da UEMA; não: casa, apartamento, abrigo;

3 - sim: maior que um; não: nenhum;

ns – não existe associação significativa ($p > 0,05$);

** – muito significativo ($p < 0,01$).

A análise univariada de associação entre as características epidemiológicas (origem, local onde vive, contactantes, acesso a rua e vida reprodutiva) e positividade para FIV, demonstrou associação muito significativa

($p < 0,01$) entre animais positivos e a variável contactantes (Tabela 13), onde, animais que tem pelo menos um contactante, estão 9,716 (OR) vezes mais propensos a apresentar a infecção.

As amplificações das amostras de felinos do município de São Luís – MA, foram baseadas no gene *gag*, de acordo com a análise da árvore de *Neighbor Joining* e modelo de Tamura e Nei (1993) demonstrando que seis amostras (SãoLuís90, 93, 79, 63, 23 e 74) agruparam com as amostras Jau26 DQ407177, Botucatu408 DQ407172 e SãoPaulo457 DQ407184, indicando fazer parte do subtipo B, com valores de *bootstrap* significativos (83%). A amostra SãoLuís117, mostrou similaridade filogenética (90% de *bootstrap*) com amostras que fazem parte do subtipo A (SanDiego M36968, Petaluma M25381 e Wo L06311) (Figura 10).

As amostras SãoLuís41 e 44 formaram um subclado (100% de *bootstrap*) independente e não agruparam com nenhum dos subtipos. Como o gene *env* apresenta maior variabilidade e capacidade mutacional, se faz necessário novos estudos com base neste gene, com clonagem das amostras estudadas e sequenciamento, para possível determinação do subtipo das amostras que geraram dúvidas.

Estudos mostraram ser possível realizar a mesma classificação genética para o vírus da FIV utilizando sequência de nucleotídeos da região p17-p24 do gene *gag* (KAKINUMA et al. 1995, HOHDATSU et al. 1998, STEINRIGL & KLEIN 2003, DUARTE & TAVARES 2005).

Adicionalmente, o gene *gag* apresenta uma taxa de conservação mais elevada que o gene *env*. Entretanto, as mutações encontradas fazem deste gene um candidato adequado para estudos filogenéticos (CLAVEL et al. 1986, GREENE et al. 1993, HOHDATSU et al. 1998).

O subtipo A foi notificado em cepas de FIV na Califórnia, Norte da Europa e Austrália, enquanto o subtipo B foi prevalente na região central e leste dos Estados Unidos, sul da Europa e Japão (SODORA et al., 1994). O subtipo C foi identificado na Califórnia, Canadá, Europa e Formosa (SODORA et al., 1994; BACHMANN et al., 1997), enquanto os subtipos D e E foram notificados no Japão (HOHDATSU et al., 1996, 1998;

NISHIMURA et al.,1998) e Argentina (PECORARO et al., 1996), respectivamente.

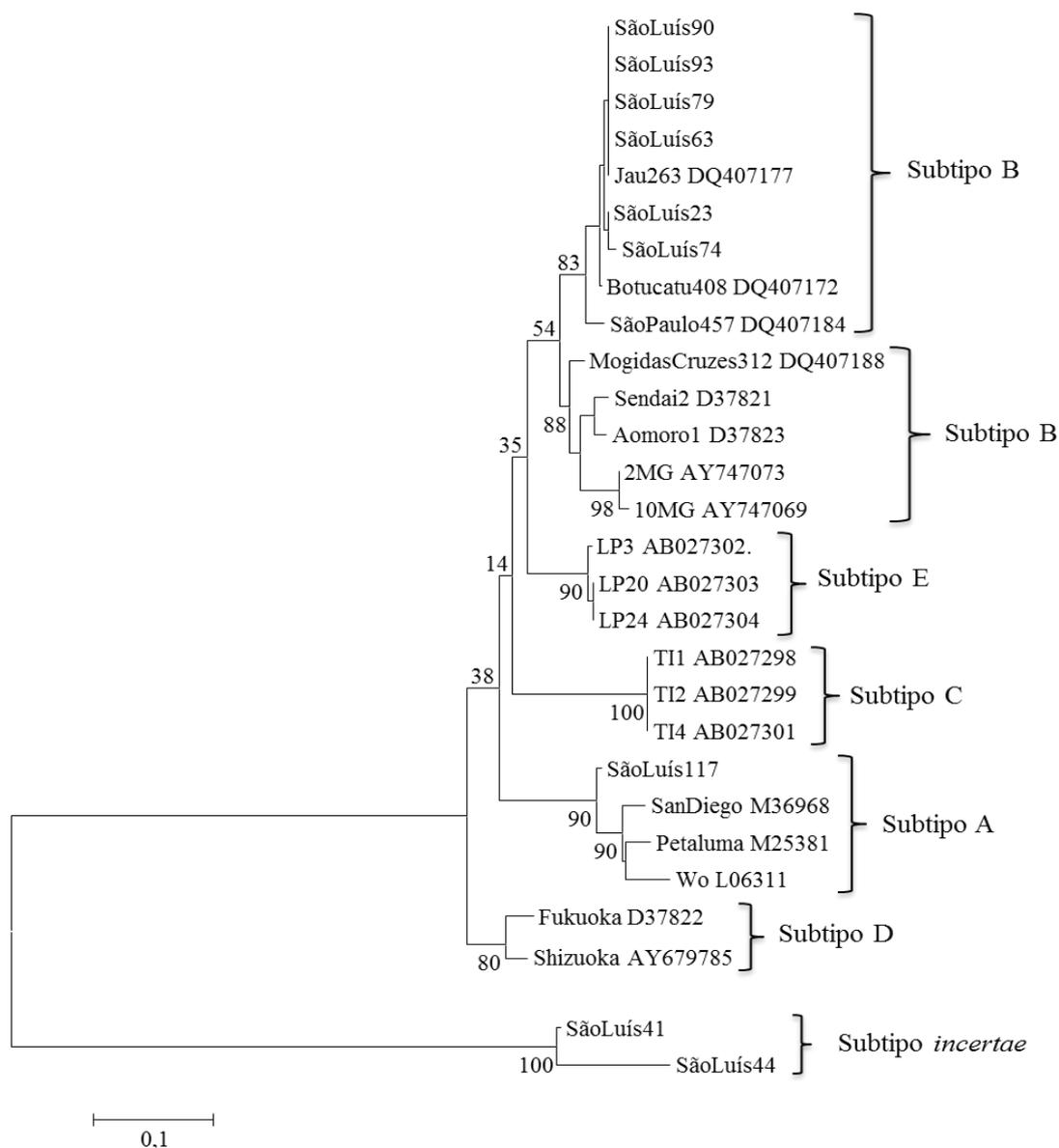


Figura 10 - Árvore filogenética construída pelo método de Neighbor-Joining e modelo de Tamura e Nei (1993) obtida pela análise de nove seqüências de nucleotídeos do gene *gag* do vírus da imunodeficiência felina em São Luís, MA. A barra de escala representa 10% de divergência entre as seqüências.

Um estudo prévio de filogenia também identificou somente a ocorrência do subtipo B em Portugal. (DUARTE et al. 2002). Posteriormente, noutro estudo, utilizando amostras de diferentes cidades de Portugal,

identificou-se também a presença do subtipo A e de um possível novo subtipo, denominado de F (DUARTE; TAVARES, 2005).

Estudo realizado por Lara et al. (2007), com amostras sequenciadas da região p17-p24 do gene *gag*, demonstrou que 23 sequências analisadas foram alocadas dentro do subtipo B do vírus da FIV, três subgrupos (1, 2 e 3) foram consistentemente identificados dentro do subtipo B. O subgrupo 1 foi formado por 15 cepas paulistas, subgrupo 2 por duas cepas estudadas e o subgrupo 3 por apenas uma das amostras (MogidasCruzes283) e por cinco cepas do FIV oriundas do Japão. As outras cinco cepas foram também alocadas no subtipo B, porém não formaram subgrupos.

Caxito et al. (2006) também estudaram a região p17-p24 do gene *gag* de 10 amostras no estado de Minas Gerais, e, estas pertenciam ao subtipo B. Observaram que a maioria delas encontra-se num subgrupo dentro do subtipo B, o que indica presença de possível ancestral comum entre elas. Na pesquisa realizada em São Luís as amostras não formaram subgrupo dentro de um mesmo subtipo, com seis amostras agrupadas no subtipo B.

Os resultados de Marçola et al. (2013) mostram que a população felina albergando o vírus da FIV é muito pequena, com a maioria dos vírus correspondentes ao subtipo B, com exceção de uma amostra que formou um grupo diferente de todos os outros subtipos conhecidos, sendo sugerido ser um novo subtipo.

As análises revelaram, com base nas sequências do estudo e nas obtidas do genbank, a presença de 21 haplótipos. Considerando as sequências do estudo houve cinco haplótipos (Hap-1, Hap-2, Hap-3, Hap-5 e Hap-6) exclusivos, o que significa dizer que o vírus da FIV é muito variável geneticamente. Apenas um haplótipo foi compartilhado (Hap-4, com quatro amostras do estudo e uma de Jau/SP). Os demais foram exclusivos para algumas localidades (Figura 11).

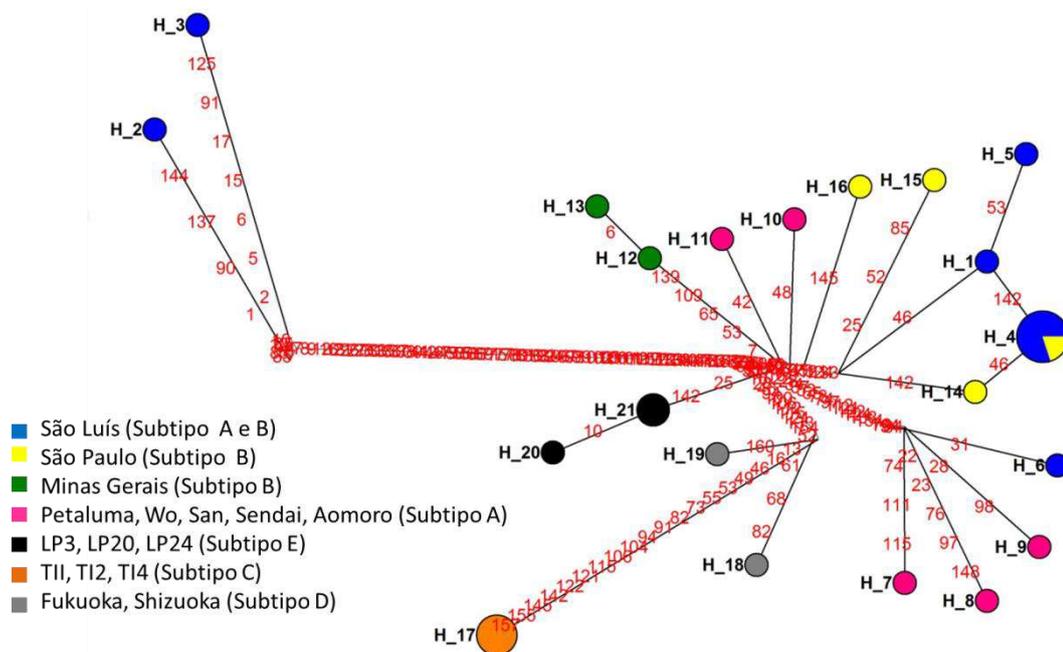


Figura 11 - Rede de haplótipos para as populações de FIV. O tamanho do círculo é proporcional à frequência com que os haplótipos ocorrem na população: H_1 (São Luís); H_2 (São Luís); H_3 (São Luís); H_4 (São Luís e SP); H_5 (São Luís); H_6 (São Luís); H_7, H_8, H_9, H_10, H_11 (amostras de outros países); H_12 e H_13 (Minas Gerais); H_14, H_15, H_16 (amostras de São Paulo); H_17 a H_21 (amostras de outros países).

A rede de haplótipos mostra um centro de dispersão a partir do haplótipo mais frequente, Hap-4, encontrado cinco vezes nas populações de São Luís e Jau/SP. Os haplótipos com maior frequência, representados neste estudo pelo Hap-4, são provavelmente os mais antigos, os primeiros vírus que vieram afetar a população de felinos em São Luís. Mas, em relação aos haplótipos 1, 5 e 6 por serem exclusivos (não estão fixos noutras populações e nem compartilhados), pode-se inferir que são vírus de FIV que evoluíram mais recentemente e que são separados ou diferentes das amostras representadas no Hap-4. Os haplótipos 2 e 3 são mais diferenciados, com muitas mutações quando comparadas às das demais amostras de São Luís e as descritas na literatura.

6 CONCLUSÕES

- Tanto o vírus da imunodeficiência felina (FIV) quanto o vírus da leucemia felina (FeLV), ocorrem no município de São Luís – MA, sendo este o primeiro registro realizado destas infecções em felinos domésticos nesta cidade;
- Alterações dermatológicas e lesões da cavidade oral parecem ser as que mais se apresentam em animais FIV positivo, não se podendo, entretanto, afirmar que seja efeito direto da infecção;
- As proporções das variáveis hematimétricas e bioquímicas entre animais FIV positivos e negativos não demonstraram diferenças estatísticas significativas ($p > 0,05$);
- As alterações hematimétricas e bioquímicas observadas não são dependentes entre si ($p > 0,05$) e as correlações verificadas estão relacionadas a outros fatores e não a infecção pelo vírus da FIV.
- O grupo de felinos domésticos do município de São Luís – MA, em maior risco, pode ser caracterizado pelos animais machos, com idade igual ou superior a 36 meses e que possuam pelo menos um contactante (ORs: 2,857, 4,765 e 9,716, respectivamente);
- O teste com melhor sensibilidade foi o Snap Combo plus e o com maior especificidade o Elisa indireto, demonstrando boa concordância entre os testes utilizados;
- Os resultados obtidos detectaram a ocorrência do subtipo B do FIV em São Luís – MA, uma amostra do subtipo A e duas amostras que não agruparam com nenhum subtipo conhecido, sendo necessárias novas pesquisas, com o intuito de esclarecer dúvidas acerca da distribuição dos subtipos do vírus da FIV no estado do Maranhão.

REFERÊNCIAS

ALVES, FABIANA. Padronização de um Elisa indireto para o diagnóstico da imunodeficiência felina a vírus. 2010. 32 p. **Dissertação** (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária. Universidade Federal de Uberlândia, MG.

ALVES, FABIANA; RAJAO, D.S; DEL PUERTO, H.L; BRAZ, G.F; LEITE, R.C; MAZUR, C; MARTINS, A.S; REIS, J.K.P. Occurrence of Feline Immunodeficiency Virus and Feline Leukemia Virus Infection in Cats. **American Journal of Animal and Veterinary Sciences**. 6: 125-129, 2011.

ALMEIDA, F.M.; FARIA, M.C.F.; BRANCO, A.S. et al. Sanitary conditions of a colony of urban feral urban cats (*Felis catus*, LINNAEUS, 1758) in a zoological garden of Rio de Janeiro, Brazil. **Revista Instituto Medicina Tropical de São Paulo**, v. 46, n. 5, p. 269-274, 2004.

AVERY PR. Hemolympathic problems. In: Lappin MR (ed) **Feline Internal Medicine Secrets**. Hanley & Belfus Inc. Cap. VII -, p.391-396, 2001.

ARAI, M., DARMEN, J., LEWIS, A., & YAMAMOTO, J.K. (2000). The use of human hematopoietic growth factors (rhGM-CSF and rhEPO) as a supportive therapy for FIV-infected cats. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. 77, 71-92.

ARAI, M., EARL, D.D., & YAMAMOTO, J.K. (2002). Is AZT/3TC therapy effective against FIV infection or immunopathogenesis? **Veterinary Immunology and Immunopathology**. 85, 189-202.

ARJONA, A., E. Escolar, et al. Seroepidemiological survey of infection by feline leukemia virus and immunodeficiency virus in Madrid and correlation with some clinical aspects. **J Clin Microbiol**, v.38, n.9, Sep, p.3448-9. 2000.

ARJONA, A., BARQUERO, N., DOMÉNECH, A., TEJERIZO, G., COLLADO, V.M., TOURAL, C., MARTÍN, D., & GOMEZ-LUCIA, E. (2007). Evaluation of a novel nested PCR for the routine diagnosis of feline leukemia virus (FeLV) and feline immunodeficiency virus (FIV). **Journal of Feline Medicine and Surgery**. 9, 14-22.

BARR MC, et al: **Feline viral diseases**. In Ettinger SJ, Feldman EC(eds): Textbook of veterinary international medicine, 4 th ed. Philadelphia, WB Saunders, 1994, pp 409-439.

BARR, F. Felineleukaemiavirus. **J Small AnimPract**, v.39, n.1, Jan, p.41-3. 1998.

BACHMANN, M. H., C. MATHIASON-DUBARD, et al. Genetic diversity of feline immunodeficiency virus: dual infection, recombination, and distinct evolutionary rates among envelope sequence clades. **J Virol**, v.71, n.6, Jun, p.4241-53. 1997.

BANDECCHI, P., D. MATTEUCCI, et al. Prevalence of feline immunodeficiency virus and other retroviral infections in sick cats in Italy. **Vet ImmunolImmunopathol**, v.31, n.3-4, Mar, p.337-45. 1992.

BANDECCHI, P., DELL'OMODARNE, M., et al. 2006. Feline leukaemia virus (FeLV) and feline immunodeficiency virus infections in cats in the Pisa district of Tuscany, and attempts to control FeLV infection in a colony of domestic cats by vaccination In: **The Veterinary Record**, **158**: 555-557.

BEATTY JA, et al: A longitudinal study of feline immunodeficiency virus-specific cytotoxic T lymphocytes in experimentally infected cats, using antigen-specific induction. **J Virol** 70: 6199, 1996.

BEEBE AM, DUA N, FAITH TG, MOORE PF, PEDERSON NC, DANDEKAR S. Primary Stage of feline immunodeficiency virus infection: viral dissemination and cellular targets. **Journal of Virology** 1994; 68 (5): 3080-3091.

BENDINELLI, M., M. PISTELLO, et al. Feline immunodeficiency virus: an interesting model for AIDS studies and an important cat pathogen. **ClinMicrobiol Rev**, v.8, n.1, Jan, p.87-112. 1995.

BLANCO, K., PRENDAS, J., CORTES, R., JIMENEZ, C., DOLZ, G. Seroprevalence of viral infections in domestic cat in Costa Rice. **J Vet Med Sci**, v. 71, p.661-663, 2009.

BRALEY, J. FELV & FIV: survey shows prevalence in the United States and Europe. **Feline Practice**, v.22, n.2, p.25-28. 1994.

BROWN, M. A., CUNNINGHAM, M. W., ROCA, A. L., TRYLER, J. L., JHONSON, W. E., O'BRIEN, S. J. Feline leukemia virus from Florida panthers. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, p. 252-259, 2008.

CALZOLARI, M., YOUNG, E., COX, D. et al. 1995. Serological diagnosis of feline immunodeficiency virus infection using recombinant transmembrane glycoprotein In: **Veterinary Immunology and Immunopathology**, **46**: 83-92.

CAXITO, FA. Detecção da subtipagem do vírus da imunodeficiência felina em Minas Gerais. 2003. 90 p. **Dissertação** (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biológicas. Universidade de Minas Gerais, MG.

CAXITO, F.A., F.M. COELHO, M.E. OLIVEIRA AND M. RESENDE, 2006. Feline immunodeficiency virus subtype B in domestic cats in Minas Gerais, Brazil. **Vet. Res. Communications**, 30: 953-956.

CALDAS, A. P. F., E. S. LEAL, et al. Detecção do provírus da Imunodeficiência Felina em gatos domésticos pela técnica de reação em cadeia da polimerase. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.20, n.1, p.20-25. 2000.

CANEY S. Feline immunodeficiency virus: un uptade. **In Practice** 2000 May; 255-260.

COELHO, F. M., MAIA, M. Q., LUPPI, M. M., COSTA, E. A., LUIZ, A. P. M. F., RIBEIRO, N. A., BOMFIM, M. R. Q., FONSECA, F. G., RESENDE, M. Ocorrência do vírus da leucemia felina em *Felis catus* em Belo Horizonte. **Arq Bras Med Vet Zootec**, v. 63, p. 778-783, 2011.

COTTER, S.M. Management of healthy feline leukemia virus-positive cats. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.199, p.1470-1473, 1991.

COTTER, S. M. Feline viral neoplasia. In: Infectious diseases of the dogs and cat, 2nd Edition, C. E. Green. W.B. **Sanders Company, Philadelphia, Pennsylvania**, 1998, p. 71-84.

COLITZ, C.M.H. (2005). Feline uveitis: diagnosis and treatment. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**. 20, 117-120.

CLAVEL, F GUYADER, M GUÉTARD, D et al. (1986) "Molecular cloning and polymorphism of the human immunodeficiency virus type 2." **Nature**, 324:691-695

CHANDLER, E. A.; GASKELL, C. J.; GASKELL, R. M. **Clínica e terapêutica em felinos**. 3.ed. Editora Roca, São Paulo. p. 498. 2006.

CHONG. Y. H.; BALL. J. M.; ISSEL, C. J. et al. Analysis of equine humoral immune responses to the transmembrane envelope glycoprotein (gp 45) of equine infectious anemia virus. **J. Viral.**, v. 65, n. 2, p. 1013-1018, 1991.

DANDEKAR S, BEEBE AM, BARLOUGH J, PHILIPS T, ELDER J, TORTEN M, PEDERSON N. Detection of feline immunodeficiency virus (FIV) nucleic acids in FIV-seronegative cats. **Journal of Virology** 1992; 66 (7): 4040-4049.

DUARTE A, MARQUES MI, TAVARES L, FEVEREIRO M. Phylogenetic analysis of five Portuguese strains of FIV. **Archives of Virology** 2002;147(5):1061-70.

DUARTE A.; TAVARES L. Phylogenetic analysis of Portuguese feline immunodeficiency virus sequences reveals high genetic diversity. **Veterinary Microbiology** 114,p. 25-33. 2005.

DUARTE, A. & TAVARES, L. (2006) Phylogenetic analysis of portuguese feline immunodeficiency virus sequences reveals high genetic diversity. **Veterinary Microbiology**, 114, 25-33.

DUARTE, A., CASTRO, I., FONSECA, I.M.P., ALMEIDA, V., CARVALHO, L. M. M., MEIRELES, J., FAZENDEIRO, M.I., TAVARES, L., VAZ, Y. Survey of infectious and parasitic diseases in stray cats at the Lisbon metropolitan area, Portugal. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 12, p. 441-446, 2010.

DUNHAM, S.P. Lessons from the cat: Development of vaccines against lentiviruses. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. 112, p. 67-77, 2006.

DUNHAM, S.P. & GRAHAM, E. (2008). Retroviral infections of small animals. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, 38, 879-901.

ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. Tratado **de Medicina Interna Veterinária**. 4 ed. São Paulo: Manole, 1995, p. 589-606.

ENGLISH RV, JOHNSON CM, GEBHARD DH, TOMPKINS MB. In vivo lymphocyte tropism of feline immunodeficiency virus. **Journal of Virology** 1993; 67 (9): 5175-5186.

FENNER´S; **Veterinary Virology**. 4. Ed. London: Academic Press, 2011. 491p.

FONTENOT, J. D.; HOOVER, E. A.; ELDER, J. E. *et al.* Evaluation of feline immunodeficiency virus and feline leukemia virus transmembrane peptides for serological diagnosis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 30, n. 7, p. 1885-1890, 1992.

FUJINO Y, HORIUCHI H, MIZUKOSHI F, *et al.* Prevalence of hematological abnormalities and detection of infected bone marrow cells in asymptomatic cats with feline immunodeficiency virus infection. **Vet Microbiol** 2008; Nov 24.

FLYNN, J. N., S. P. DUNHAM, *et al.* Longitudinal analysis of feline leukemia virus-specific cytotoxic T lymphocytes: correlation with recovery from infection. **J Virol**, v.76, n.5, Mar, p.2306-15. 2002.

GOMEZ, N.; SCARAMAL, J.; MIRA, G. *et al.* Prevalence of FIV and FeLV in 300 cats in Argentina. **Veterinaria Argentina**, v. 16, n. 160, p. 786-793, 1999.

GOMES-KELLER, M.A., GONCZI, E., TANDON, R., RIONDATO, F., HOFMANN-LEHMANN, R., MELI, M.L., & LUTZ, H. (2006b). Detection of feline leukemia virus RNA in saliva from naturally infected cats and correlation of PCR results with those of current diagnostic methods. **Journal of Clinical Microbiology**. 44(3), 916-922.

GLEICH, S. E., KRIEGER, S., HARTMANN, K. Prevalence of feline immunodeficiency virus and feline leukemia virus among client-owned cats and risk factors for infection in Germany. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 11, p 985-992, 2009.

GRACE, S. F., (2011a). **Feline immunodeficiency virus infection**. In G. D. Norsworthy, M. A. Crystal, S. F. Grace, L. P. Tilley (Eds.) *The Feline Patient* (4th ed.) (179-180). Iowa, USA: Blackwell Science Ltd.

GRACE, S. F., (2011b). **Herpesvirus infection**. In G. D. Norsworthy, M. A. Crystal, S. F. Grace, L. P. Tilley (Eds.) *The Feline Patient* (4th ed.) (225-227). Iowa, USA: Blackwell Science Ltd.

GRACE, S. F. Infecção pelo vírus da Imunodeficiência felina. IN: NORSWORTHY, G. D.; CRYSTAL, M.A.; GRACE, S. F.; TILLEY, L. P. **O Paciente felino**. 1 ed. São Paulo: Manole, 2004, p.244-247.

GRANT CK, FINK EA, SUNDSTROM M, TORBETT BE, ELDER JH. Improved health and survival of FIV-infected cats is associated with the presence of autoantibodies to the primary receptor, CD134. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 2009;106:19980–5.

GREENE, C. E. Feline Foamy (Syncytium-Forming) Virus Infection. In: C. E. Greene (Ed.). *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. St. Louis: Elsevier, 2006. Feline Foamy (Syncytium-Forming) **Virus Infection**, p.154-155.

HALL, TA., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, vol. 41, p. 95-98.

HAGIWARA, M. K.; RECHE, JR. A.; LUCAS, S. R. R. Estudo clínico da infecção de felinos pelo vírus da leucemia felina em São Paulo. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**. v.4, n.1, 1997, p.35-38.

HAYWARD, J.J., TAYLOR, J. & RODRIGO, A.G. (2007) Phylogenetic analysis of feline immunodeficiency virus in feral and companion domestic cats of New Zealand. **Journal of Virology**, 81, 2999-3004.

HARTMANN, K. 1998. Feline Immunodeficiency Virus Infection: an Overview In: **The Veterinary Journal**, 155: 123-137.

HARTMANN, K. Feline Leukemia Virus Infection. In: C. E. Greene (Ed.). *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. St. Louis: Elsevier, 2006. **Feline Leukemia Virus Infection**, p.105-131

HARTMANN, K.; GRIESSMAYR, P.; SCHULZ, B. et al. Quality of different in-clinic test systems for feline immunodeficiency virus and feline leukaemia virus infection. **J. Fel. Med. Surg.**, v. 9, n. 6, p. 439-45, 2007.

HARTMANN, K. Clinical aspects of feline immunodeficiency and feline leukemia virus infection. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, 143, p 190-201, 2011.

HOSIE, M. J., C. ROBERTSON, et al. Prevalence of feline leukaemia virus and antibodies to feline immunodeficiency virus in cats in the United Kingdom. **Vet Rec**, v.125, n.11, Sep 9, p.293-7. 1989.

HOSIE, M. J. & O. JARRETT. **Serological responses of cats to feline immunodeficiency virus**. **AIDS**, v.4, n.3, Mar, p.215-20. 1990.

HOSIE, M.J., ADDIE, D., BELÁK, S., BOUCRAUT-BARALON, C., EGBERINK, H., FRYMUS, T., GRUFFYDD-JONES, T., HARTMANN, K., LLORET, A., HOFMANN-LEHMANN, R., CATTORI, V., TANDON, R., BORETTI, F.S., MELI, M.L., RIOND, B., PEPIN, A.C., WILLI, B., OSSENT, P., & LUTZ, H. (2007). Vaccination against the feline leukaemia virus: outcome and response categories and long-term follow-up. **Vaccine**.25, 5531-5539.

HOHDATSU T, YAMADA M, OKADA M, FUKASAWA M, WATANABE K, OGASAWARA T, TAKAGI M, AIZAWA C, HAYAMI M, KOYAMA H. Detection of feline immunodeficiency proviral DNA in peripheral blood lymphocytes by the polymerase chain reaction. **Veterinary Microbiology** 1992; 30 (2-3): 113-23.

HOHDATSU, T. et al. Comparative study of the cell tropism of feline immunodeficiency virus isolates of subtypes A, B and D classified on the basis of the *env* gene V3-V5 sequence. Printed in Great Britain. **Journal of General Virology**, n. 77, p. 93-100, 1996.

HOHDATSU, T., K. MOTOKAWA, et al. Genetic subtyping and epidemiological study of feline immunodeficiency virus by nested polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of the gag gene. **J Virol Methods**, v.70, n.1, Jan, p.107-11. 1998.

HOPPER, C.D.; SPARKES, A.H.; GRUFFYDD-JONES, T.J. et al. Clinical and

laboratory findings in cats infected with feline immunodeficiency virus. **Veterinary Record**, v. 125, n. 13, p. 341-346, 1989.

ISHIDA, T., T. WASHIZU, et al. Feline immunodeficiency virus infection in cats of Japan. **J Am Vet Med Assoc**, v.194, n.2, Jan 15, p.221-5. 1989.

JOHNSON, C.M. (2005). Transmission of feline immunodeficiency virus [versão electrónica]. **56th Annual Meeting of the American College of Veterinary Pathologists (ACVP)**. 3-7 December.

KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. - **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**, Academic Press, 1997, 5ª edição, 932 p.

KAKINUMA S, MOTOKAWA K, HOHDATSU T, YAMAMOTO JK, KOYAMA H, HASHIMOTO H. Nucleotide sequence of feline immunodeficiency virus: classification of Japanese isolates into two subtypes which are distinct from non-japanese subtypes. **Journal of Virology** 1995; 69 (6): 3639-3646.

KOLENDA-ROBERTS, H.M., KUHNT, L.A., JENNINGS, R.N., MERGIA, A., GENGOZIAN, N., & JOHNSON, C.M. (2008). Immunopathogenesis of feline immunodeficiency virus infection in the fetal and neonatal cat. **Front Bioscience**. 12, 3668-3682.

KUSUHARA, H., HOHDATSU, T., OKUMURA, M., SATO, K., SUZUKI, Y., MOTOKAWA, K., GEMMA, T., WATANABE, R., HUANG, C., ARAI, S. & KOYAMA, H. (2005). Dual-subtype vaccine (Fel-O-Vax FIV) protects cats against contact challenge with heterologous subtype B FIV infected cats. **Veterinary Microbiology**, 108, 155-165.

LAIRMORE, M.D., (2011). **Retroviridae**. In N.J MacLachlan & E.J. Dubovi (Eds.) **Fenner's Veterinary Virology** (4th Edition) (242-274). San Diego, CA, USA: Academic Press of Elsevier.

LANORE, D. (2004). Clinical case 1: management of symptomatic retrovirus infections in a female cat using a treatment with feline omega interferon. In K. de Mari (Ed.), **Veterinary Interferon Handbook**. (pp.59-63). UK: Virbac, S.A.

LA CROIX, N. C. (2005). Ocular manifestations of systemic disease in cats. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**. 20, 121-128.

LARA, V. M., S. A. TANIWAKI, et al. Occurrence of feline immunodeficiency virus in domestic cats naturally infected. **Virus Rev. Res.**, v.06, p.173. 2001.

LARA, V. M.; TANIWAKI, S. A.; ARAÚJO, J. P. Phylogenetic characterization of feline immunodeficiency virus (FIV) isolates from the state of São Paulo. Caracterização filogenética de amostras do vírus da imunodeficiência felina (FIV) do Estado de São Paulo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 27, n.11, p.467-470. 2007.

LARA, V.M., S.A. TANIWAKI AND J.P.A. JUNIOR. Occurrence of feline immunodeficiency virus infection in cats. **Ciência Rural.**, v.38, n.8, p.2245-2249, nov, 2008.

LEVY, J.; CRAWFORD, C.; HARTMANN, K. et al. American association of feline practitioners' feline retrovirus management guidelines. **J. Feline Med. Surg.**, v.10, p.300-316, 2008.

LINENBERGER, M. L., ABKOWITZ, J. L. **Haematological disorders associated with feline retrovirus infections.** In: Baillieres Clinical Haematology. 1998; 8: 73-112.

LITTLE, S.E. 2005. Feline immunodeficiency virus testing in stray, feral, and client-owned cats of Ottawa In: **The Canadian Veterinary Journal**, **46**: 898-901.

LIN, J. A.; CHENG, M. C.; INOSHIMA, Y.; et al. Seroepidemiological survey of feline retrovirus infections in cats in Taiwan in 1993 and 1994. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 57, n. 1, p. 161-163, 1995.

LUTZ, H., MARSILIO, F., PENNISI, M.G., RADFORD, A. D., THIRY, E., TRUYEN, U. & HORZINEK, M.C. (2009). ABCD guidelines on feline immunodeficiency virus. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, 11 (7), 575-584.

MARÇOLA, T.G; GOMES, C.P.C; SILVA, P.A; FERNANDES, G.R; PALUDO, G.R; PEREIRA, R.W. Identification of a novel subtype of feline immunodeficiency virus in a population of naturally infected felines in the Brazilian Federal District. **Virus Genes**, 46:546-550, 2013.

MARUYAMA, S., KABEYA, H., NAKAO, R., TANAKA, S., SAKAI, T., XUAN. X., KATSUBE, Y., MIKAMI, T. Seroprevalence of *Bartonella henselae*, *Toxoplasma gondii*, FIV and FeLV infection in domestic cats in Japan. **Microbiol. Immunol**, v. 47, p. 147-153, 2003.

MARI, K., MAYNARD, L., SANGUER, A., et al. 2004. Therapeutic effect of recombinant feline interferon-omega on feline leukemia virus (FeLV) - infected and FeLV/ feline immunodeficiency virus (FIV).coinfected symptomatic cats In: **Journal of Veterinary Internal Medicine/ American College of Veterinary Internal Medicine**, 18: 477-482.

MALIK, R., K. KENDALL, et al. Prevalences of feline leukaemia virus and feline immunodeficiency virus infections in cats in Sydney. **Aust Vet J**, v.75, n.5, May, p.323-7. 1997.

MERMER, B.; HILLMAN, P.; HARRIS, R. et al. A recombinant-based feline immunodeficiency virus antibody enzyme-linked immunosorbent assay. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 35, n. 1-2, p. 133-41, 1992.

MERCK. Feline leukemia vírus and related disease: introduction. IN: **The Merck Veterinary Manual**. Estados Unidos, 2006. Disponível em: <http://vetmanual.com/mvm/index.jsp>. Acesso em: 12 fevereiro de 2013.

MIYAZAWA T, TOMONAGA K, KAWAGUCHI Y, MIKAMI, T. The genome of feline immunodeficiency virus. **Archives of Virology** 1994; (134): 221-234.

MURPHY, F.A.; GIBBS, E. P.J.; HORZINEK, M.C.; STUDDERT, M.J. **Veterinary Virology**. 3ed. California: Academic Press, 1999, p. 363-389.

NEIL, J. C. Feline leukemia and sarcoma viruses In: **Encyclopedia of Virology**. 3^aed.pg 185-190. Oxford: Elsevier, 2008.

NISHIMURA, Y.et al. Genetic heterogeneity of *env* gene of feline immunodeficiency virus obtained from multiple districts in Japan. **Virus Res**. n.57, p.101-112.1998.

NORRIS, J.M., BELL, E.T., HALES, L., et al. 2007. Prevalence of feline immunodeficiency virus infection in domesticated and feral cats in eastern Australia In: **Journal of Feline Medicine and Surgery**, **9**: 300-308.

O' CONNOR TP JR, TONELLI QJ, SCARLETT JM. Report of the national FeLV/FIV awareness project. **Journal of the American Veterinary Medical Association** 1991; 199 (10): 1348-1353.

OLMSTED, R. A., V. M. HIRSCH, et al. Nucleotide sequence analysis of feline immunodeficiency virus: genome organization and relationship to other lentiviruses. **Proc Natl Acad Sci**, U S A, v.86, n.20, Oct, p.8088-92. 1989.

PANCINO G, FOSSATI I, CHAPPEY C, CASTELOT S, HURTREL B, MORAILLON A, KLATZMANN D, SONIGO P. Structure and variations of feline immunodeficiency virus envelope glycoproteins. **Virology** 1993; 192 (2): 659-662.

PAILOT R, RICHARD S, BLOAS F, PIRAS F, POULET H, BRUNET S, ANDREONI C, JUILLARD V. Toward a detailed characterization of feline immunodeficiency virus-specific T cell immune responses and mediated immune disorders. **Veterinary Immunology and Immunopathology** 2005; 106 (1-2): 1-14.

PECORARO, M. R. et al. Genetic diversity of Argentine isolates of feline immunodeficiency virus. **J Gen Virol**. n.77, p. 2031–2035.1996.

PEDERSEN, N. C., E. W. HO, et al. Isolation of a T-lymphotropic virus from domestic cats with an immunodeficiency-like syndrome. **Science**, v.235, n.4790, Feb 13, p.790-3. 1987.

PEDERSEN, N. C., J. K. YAMAMOTO, et al. Feline immunodeficiency virus infection. **Vet Immunol Immunopathol**, v.21, n.1, May, p.111-29. 1989.

PEDERSON NC, BARLOUGH JE. Clinical overview of feline immunodeficiency virus. **Journal of the American Veterinary Medical Association** 1991; 199 (10): 1298-1305.

PEDRETTI, E., PASSERI, B., AMADORI, M., ISOLA, P., DI PEDE, P., TELERA, A., VESCOVINI, R., QUINTAVALLA, F., & PISTELLO, M. (2006). Low-dose interferon- α treatment for feline immunodeficiency virus infection. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. 109, 245-254.

PEREIRA, J.M. & TAVARES, L. (2002). In V.F.C. Ferreira & J.C.F. de Sousa (Eds.) **Microbiologia**, vol. 3, 275-313. Lisboa, Portugal: Lidel.

PINCHES, M.D., HELPS, C.R., GRUFFYDD-JONES, T.J., EGAN, K., JARRETT, O., & TASKER, S. (2007b). Diagnosis of feline leukaemia virus infection by semi-quantitative real-time polymerase chain reaction. **Journal of Feline Medicine and Surgery**. 9, 8-13.

PU, R., J. COLEMAN, et al. Dual-subtype FIV vaccine (Fel-O-Vax FIV) protection against a heterologous subtype B FIV isolate. **J FelineMedSurg**, v.7, n.1, Feb, p.65-70. 2005.

RAVAZZOLLO, A. P. & U. COSTA. Retroviridae. In: E. F. Flores (Ed.). **Virologia Veterinária**. Rio Grande do Sul: UFSM, 2007. Retroviridae, p.809-838.

RECHE JUNIOR, A; HAGIWARA, M. K; LUCAS, S. R. R. Clinical study of acquired immunodeficiency syndrome in domestic cats in Sao Paulo. **Braz. j. vet. res. anim. sci**; 34 (3):152-5, 1997.

REID, G.; RIGBY, M. A.; MCDONALD, M. *et al.* Immunodiagnosis of feline immunodeficiency virus infection using recombinant viral p17 and p24. **AIDS**. v. 5, n. 12, p. 1477-83, 1991.

RICHARDS, J.R., ELSTON, T.H., FORD, R.B., GASKELL, R.M., HARTMANN, K., HURLEY, K.F., LAPPIN, M.R., LEVY, J.K., RODAN, I., SCHERK, M., SCHULTZ, R.D. & SPARKES, A.H. (2006) The 2006 American Association of Feline Practitioners: Feline Vaccine Advisory Panel Report. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, 229, 1405-1441.

RIMSTAD E, UELAND K. Detection of feline immunodeficiency virus by a nested polymerase chain reaction. **Journal of Virological Methods**; 36(3): 239-248, 1992.

RIVETTI JÚNIOR, A. V. Retrovíroses, toxoplasma gondii e Mycoplasma haemofelis em gatos errantes e felinos selvagens do Zoológico de Belo Horizonte-MG. 2006. 38 p. **Dissertação** (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária. Universidade de Minas Gerais, MG.

RODRIGUES, A.M.A; ZANUTTO, M.S; HAGIWARA, MK. Concentrações séricas de proteína total, albumina e gamaglobulinas em gatos infectados pelo vírus da imunodeficiência felina. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.37, n.1, p.153-158, jan-fev, 2007.

ROJKO, J. L. & W. D. HARDY. Feline leukemia virus and other retroviruses. In: R. G. Sherding (Ed.). *The Cat: Diseases and Clinical Management*. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1994. **Feline leukemia virus and other retroviruses**, p.263-432.

SELLON, R.K., HARTMANN, K (2006). Feline Immunodeficiency Virus Infection. In Greene, C.E. (ed.) **Infectious Diseases of the Dog and Cat**. (3th ed.) (131-142). St. Louis, Missouri, USA: Saunders Elsevier.

SOBRINHO, L.S.V; VIDES, J.P; BRAGA, E.T; GOMES, A.M.D; ROSSI, C.N, MARCONDES, M. Sorofrequência de infecção pelo vírus da imunodeficiência felina e vírus da leucemia felina em gatos do município de Araçatuba, São Paulo. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, São Paulo, v.48, n.5, p.378-383, 2011.

SODORA, D. L. et al. Identification of three feline immunodeficiency virus (FIV) env gene subtypes and comparison of the FIV and human immunodeficiency virus type 1 evolutionary patterns. **J Virol.**; 68:p. 2230–2238.1994.

SPARGER EE: Current thoughts on feline immunodeficiency virus infection. **Vet Clin North Am Small Anim Pract** 23:173, 1993.

SPARKES, A. H., C. D. HOPPER, et al. Feline immunodeficiency virus infection. Clinicopathologic findings in 90 naturally occurring cases. **J Vet Intern Med**, v.7, n.2, Mar-Apr, p.85-90. 1993.

STEINRIGL, A. E.; KLEIN, D. Phylogenetic analysis of feline immunodeficiency virus in Central Europe: a prerequisite for vaccination and molecular diagnostics. **J. Gen. Virol.** 84 p.,1301-1307, 2003.

STEWART, H., JARRETT, O., HOSIE, M. J., WILLETT, B. J. Are endogenous feline leukemia viruses really endogenous? **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v 143, p. 325-331, 2011.

STUTZER, B., MULLER, F., MAJZOUB, M., LUTZ, H., GREENE, C. E., HERMANN, W., HARTMANN, K. Role of latent feline leukemia virus infection in nonregenerative cytopenias of cats. **J Vet Intern Med**, v.24, p. 192-197, 2010.

SIBILLE, P., AVRAMEAS, A., MORAILLON, A. 1995. Comparison of serological tests for the diagnosis of feline immunodeficiency virus infection of cats In: **Veterinary Microbiology**, **45**: 259-267.

SOUZA, H. J. M., C. H. R. TEIXEIRA, et al. Estudo epidemiológico de infecções pelo vírus da leucemia e/ou imunodeficiência felina, em gatos domésticos do município do Rio de Janeiro. **Clínica Veterinária**, v.36, n.1-2, p.14-21. 2002.

SOUZA, H. J. M.; TEIXEIRA, C, H. R. Leucemia viral felina. IN: **Coletânea em Medicina e Cirurgia Felina**. Rio de Janeiro: L. F. Livros, 2003, cap.22, p. 251-272.

SHELTON, G.H., GRANT, C.K., COTTER, S.M., GARDNER, M.B., HARDY JR., W.D., DIGIACOMO, R.F., 1990. Feline immunodeficiency virus and feline leukemia virus infections and their relationships to lymphoid malignancies in cats: a retrospective study (1968–1988). **J. Acquir. Immune Defic. Syndr.** 3, 623–630.

TANDON, R.; CATTORI, V.; PEPIN, A.C. et al. Association between endogenous feline leukemia virus loads and exogenous feline leukemia virus infection in domestic cats. **Virus Res.**, v.135, p.136-143, 2008.

TANG, H.; KUNHEN, K.L.; WONG-STAAAL, F. Lentivirus replication and regulation. **Annual Review of Genetics**, v. 33, n. 1, p. 133-170, 1999.

TAMURA K, PETERSON D, PETERSON N, STECHER G, NEI M, KUMAR S (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum

Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution**, 28: 2731-2739.

TAMURA K & NEI M (1993) Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. **Molecular Biology and Evolution**, 10: 512-526.

TEIXEIRA, B. M. et al. Ocorrência da infecção pelo vírus da imunodeficiência felina e da leucemia felina em gatos de Belo Horizonte. 205. 45 p. **Dissertação** (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária. Universidade de Minas Gerais, MG.

TEIXEIRA, B. M., D. S. RAJÃO, et al. Ocorrência do vírus da imunodeficiência felina e do vírus da leucemia felina em gatos domésticos mantidos em abrigos no município de Belo Horizonte. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**, v.59, n.4, p.939-942. 2007.

TIQUE, V., SÁNCHEZ, A., ÁLVAREZ, L., RIOS, R., MATTAR, S. Seroprevalence del vírus de leucemia e imunodeficiencia felina em gatos de Montería, Córdoba. **Rev Med Vet Zoo**, v. 56, p. 85-94, 2009.

TORRES, A. N.; MATHIASON, C. K.; HOOVER, E. A. Re-examination of feline leukemia virus: host relationships using real-time PCR. **Virology**. V.332, 2005, p.272-283.

TORRES, A.N.; O'HALLORAN, K.P.; LARSON et al. Feline leukemia virus immunity induced by whole inactivated virus vaccination. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v.134, p.122-131, 2010.

THOMPSON, JD., HIGGINS, DJ. and GIBSON, TJ., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, vol. 22, no. 22, p. 4673–4680.

THOMAS, J.; ROBINSON, W. Infección por el virus de la inmunodeficiencia felina. **Waltham Focus**, v. 5, n. 2, p. 24-30, 1993.

WEAVER E.A. et al. Phylogenetic analysis of Texas isolates indicate an evolving subtype of the clade B Feline Immunodeficiency Viruses. **J. Virol.** v.78:p,2158-2163, 2004.

FELSENSTEIN J (1985) Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. **Evolution**, 39:783-791.

YAMAMOTO, J. K., E. SPARGER, et al. Pathogenesis of experimentally induced feline immunodeficiency virus infection in cats. **Am J Vet Res**, v.49, n.8, Aug, p.1246-58. 1988.

YAMAMOTO, J.K.; HANSEN, H.; HO, E.W. et al. Epidemiology and clinical aspects of feline of feline immunodeficiency virus infection in cats from the continental United States and Canada and possible mode of transmission. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, v. 194, n. 1, p. 213, 1989.

YAMAMOTO, J.K., PU, R. SATO, E. & HOHDATSU, T. (2007). **Feline immunodeficiency virus pathogenesis and development of a dual-subtype feline-immunodeficiency-virus vaccine.** *AIDS*, 21, 547-563.

YILMAZ, H.; ILGAZ, A.; HARBOUR, D. A. Prevalence of FIV and FeLV infections in cats in Istanbul. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 2, n.1, p.69-70, 2000.

ZANUTTO M.S., FROES T.R., TEIXEIRA A.L. & HAGIWARA M.K. Características clínicas da fase aguda da infecção experimental de felinos pelo vírus da imunodeficiência felina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 31(3): 255-260, 2011.

ZEIDNER, N.S., MYLES, M.H., MATHIASON-DUBARD, C.K., DREITZ, M.J., MULLINS, J.I. & HOOVER, E.A. (1990). Alpha interferon (2b) in combination with zidovudine for the treatment of presymptomatic feline leukemia virus-induced immunodeficiency syndrome. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, 34, 1749-56.

APÊNDICE



Mestrado em Ciência Animal

Ficha de Identificação

Dados do responsável pelo felino

Proprietário: _____

Endereço: _____

Clínica Veterinária: _____

Veterinário responsável: _____

Dados do Animal

1) Nome do animal: _____

2) Sexo: _____

3) Idade: _____

4) Raça: _____

5) Origem (Procedência): () Nascido em domicílio; () Gatil;

() Pet shop; () Encontrou na rua; () Não relatada

6) Ambiente onde vive: () casa; () apartamento; () rua;

() abrigo de animais

7) Convive com outros gatos em domicílio/abrigo? Quantos? _____

8) Estado de higidez dos contactantes () sadio () doente

9) Tem acesso à rua? () sim () não

10) Vida reprodutiva: () castrado () não castrado

11) É vacinado? () sim () não Quais? _____

12) Sintomatologia clínica: _____

13) Já fez transfusão sanguínea? () sim () não

14) Está sendo medicado? () sim () não _____

15) Histórico de doenças anteriores: _____

16) Observações: _____

17) Data: _____ / _____ / _____