



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA
INSTITUTO DE SAÚDE E PRODUÇÃO ANIMAL

CAMILA DE CASSIA DOS SANTOS
KELY FEITOSA VALENTE

**DETECTAÇÃO DO VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA FELINA EM GATOS
DOMÉSTICOS (FELIS CATUS) PELA TÉCNICA DE REAÇÃO EM CADEIA
MEDIADA PELA POLIMERASE.**

BELÉM
2019

**CAMILA DE CASSIA DOS SANTOS
KELY FEITOSA VALENTE**

**DETECTAÇÃO DO VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA FELINA EM GATOS
DOMÉSTICOS (FELIS CATUS) PELA TÉCNICA DE REAÇÃO EM CADEIA
MEDIADA PELA POLIMERASE.**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Universidade Federal Rural da Amazônia como parte das exigências para obtenção do título de bacharel em Medicina veterinária.

Orientador: Alexandre do Rosário Casseb

Coorientadora: Lívia Medeiros Neves Casseb

**BELÉM
2019**

Santos, Camila de Cassia dos

Detecção do Vírus da Imunodeficiência Felina em gatos domésticos (felis catus) pela técnica de reação em cadeia mediada pela Polimerase / Camila de Cassia dos Santos, Kely Feitosa Valente. - Belém, 2019. 27 f.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Medicina Veterinária) – Universidade Federal Rural da Amazônia, 2019.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre do Rosário Casseb.

1. Vírus da Imunodeficiência Felina 2. Gatos Domésticos -PCR 3. Perfil Epidemiológico – Gatos domésticos. I. Valente, Kely Feitosa. II. Casseb, Alexandre do Rosário (orient.). III. Título

CDD – 636.8089691

CAMILA DE CASSIA DOS SANTOS

KELY FEITOSA VALENTE

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Universidade Federal Rural da
Amazônia como parte das exigências para obtenção do título de bacharel em
Medicina veterinária.

Aprovado em 13 de fevereiro de 2019

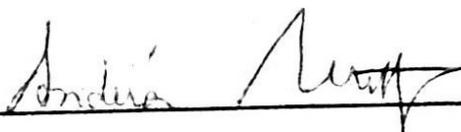
BANCA EXAMINADORA



Prof Dr Alexandre do Rosário Casseb Orientador
Universidade Federal Rural da Amazônia-UFRA



MV. Dr^a Livia Medeiros Neves Casseb
Coorientadora
Instituto Evandro Chagas



Prop Dr^a Andrea Maria Góes Negrão
Universidade Federal Rural da Amazônia-UFRA



Prop Dr^a Fabiola Elizabeth Villanova
Universidade Federal do Pará-UFPA

RESUMO:

O Vírus da Imunodeficiência Felina (FIV) é um *lentivirus* da família *Retroviridae*, afeta os felinos domésticos e selvagens com distribuição mundial e causa preocupações na clínica veterinária devido a associações com várias doenças do sistema imunológico. O diagnóstico dá-se mediante a exames laboratoriais como Ensaio imunoenzimático (ELISA), reação em cadeia mediada pela polimerase (PCR), isolamento em cultivo celular entre outros. A doença é classificada em 3 principais categorias: aguda, crônica e terminal e dependendo do estágio da doença e a resposta imunológica do animal há possibilidade de falsos negativos em algumas técnicas de detecção viral. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi detectar a presença do ácido desoxirribonucléico proviral do Vírus da Imunodeficiência Felina em animais assintomáticos, provindos do projeto Vida Digna da Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA). Para isto, foram coletadas 50 amostras de sangue de gatos encaminhados ao projeto e foi realizada a extração do ácido desoxirribonucleico. Estas amostras foram testadas em duas reações de PCR utilizando-se dois conjuntos de primers do Gene gag de FIV. Achou-se uma prevalência de 2% (1/50), confirmando assim a presença do vírus na cidade de Belém e a importância de testar os felinos mesmo sendo assintomáticos. Faz-se necessário a realização de trabalhos futuros que amplie o número amostral dos animais testados para assim elucidar o perfil epidemiológico da doença na região de Belém do Pará, levando em consideração a relevância clínica desta infecção e a correta conduta médica veterinária para evitar novas infecções.

Palavras-chave: PCR. FIV. Diagnostico. Análise Molecular

ABSTRACT:

The Feline Immunodeficiency Virus (FIV) is a lentivirus of the family Retroviridae, affects domestic and wild cats with worldwide distribution and causes concerns in the veterinary clinic due to associations with various diseases of the immune system. The diagnosis is made through laboratory tests such as immunoenzymatic assay (ELISA), polymerase chain reaction (PCR), isolation in cell culture, among others. The disease is classified into 3 main categories: acute, chronic and terminal and depending on the stage of the disease and the immune response of the animal there is possibility of false negatives in some viral detection techniques. Therefore, the objective of this work was to detect the presence of proviral deoxyribonucleic acid from the Feline Immunodeficiency Virus in asymptomatic animals, from the Life Digna project of the Federal Rural University of Amazonia (UFRA). For this purpose, 50 blood samples of cats were collected and the extraction of deoxyribonucleic acid was carried out. These samples were tested in two PCR reactions using two sets of FIV gag Gene primers. A prevalence of 2% (1/50) was found, thus confirming the presence of the virus in the city of Belém and the importance of testing the felines even though they are asymptomatic. Future work is needed to expand the sample size of the animals tested to elucidate the epidemiological profile of the disease in the region of Belém do Pará, taking into account the clinical relevance of this infection and the correct veterinary medical conduct to avoid new infections.

Keywords: PCR. FIV. Diagnosis. Molecular Analysis

LISTA DE SIGLAS

DNA	Ácido desoxirribonucleico
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
FELV	Vírus da leucemia felina
FIV	Vírus da imunodeficiência felina
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
PCR	Reação em cadeia mediada pela Polimerase
RNA	Ácido ribonucleico

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Taxonomia	3
2.2. Replicação viral	4
2.3. Epidemiologia	5
2.4. Clínica	6
2.5. Diagnóstico	9
2.6. Tratamento	12
3. MATERIAL E METODOS	14
3.1. Amostras	14
3.2. Extração de DNA	14
3.3. Processamento PCR	14
3.4. Eletroforese em gel de agarose	15
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	15
5. CONCLUSÃO	18
6. REFERÊNCIA	19

1. INTRODUÇÃO

A clínica médica veterinária atende, cada vez mais, os felinos. É notável o aumento desses pets nos lares brasileiros e geralmente a residência não permanece com apenas um gato devido a facilidade em sua adaptação, independência que aliado ao novo estilo de vida da população, manter um gato como companhia acaba sendo uma ótima escolha. Em dados publicados pelo IBGE (2016), são mais de 52 milhões de cães e 22 milhões de gatos, mostrando que em 44,3% dos lares brasileiros existe ao menos um cão e 17,7% ao menos um gato.

O gato não é um pequeno cachorro, ele possui peculiaridades em comportamento, fisiologia, patologias e o aumento da expectativa de vida desses animais gera um impacto direto sobre a incidência de doenças antes consideradas raras. A disseminação de informações sobre posse responsável também tem mudado o comportamento dos proprietários destes animais, tornando-os mais exigentes e assim, buscam precisão nos diagnósticos e tratamentos dos seus gatos.

Uma dessas particularidades em doença é o vírus da imunodeficiência felina a qual é uma retrovírose que atinge o sistema imunológico do animal e por ainda não possuir vacina e tratamento curativo possui grande relevância na clínica de pequenos animais.

O vírus apresenta alta prevalência em cidades como Belo Horizonte, Rio de Janeiro, São Paulo, porém na região norte especificamente na cidade de Belém do Pará é escasso o registro desta enfermidade, principalmente por falta da confirmação laboratorial. As análises laboratoriais são um grande aliado na clínica. Gatos infectados pelo FIV pode ser portador assintomático por anos e dessa forma transmitir o patógeno a vários outros felinos.

O FIV é classificado em cinco subtipos: *A, B, C, D e E* e ocorre em três principais fases: aguda, crônica e terminal. (SCHMITT, 2003). Os subtipos F e U foram os mais recentemente descobertos, nomeadamente nos Estados Unidos e Nova Zelândia 16 (FERNANDES, 2015).

A transmissão do vírus dá-se principalmente por mordidas, ou seja, animais de rua, abrigos, não castrados e em locais de alta densidade são mais propensos a contrair esta enfermidade.

Existem diferentes análises para a detecção do FIV como imunoenaios enzimáticos (ELISA) tradicionais, kits rápidos de ELISA (testes rápidos),

imunofluorescência indireta (IFI), reação em cadeia mediada pela polimerase (PCR) e isolamento viral, porém dependendo do estágio da doença há a possibilidade de falsos negativos, por isso é de extrema importância conhecer o percurso da doença e analisar o animal minuciosamente. (ADAM E DANDRIEUX, 2011).

O PCR pode detectar o FIV a partir da primeira a terceira semana após a infecção. Desse modo, consiste em uma ferramenta extremamente sensível para a ampliação e detecção de pequenas quantidades de DNA ou de RNA viral (AVERY, 2001).

As retrovíroses possuem a enzima transcriptase reversa e algumas enzimas transportadoras as quais produzem uma cópia de DNA a partir de um filamento duplo do RNA do vírus. Esta cópia de DNA, denominada pró-vírus, integra-se ao DNA cromossômico da célula do hospedeiro capacitando o vírus de replicar-se junto com a célula infectada. (BARR; PHILLIPS, 2008).

A detecção do DNA indica que o vírus entrou na célula e se integrou ao genoma do hospedeiro e a detecção do RNA viral pelo PCR indica a ocorrência de produção viral. Conforme avança da fase aguda para a fase de portador assintomático, no organismo animal há um decréscimo na carga viral, depois os níveis de RNA viral no plasma permanecem relativamente estáveis (AVERY, 2001).

Desta forma, o PCR para detecção do DNA proviral tem maior relevância para o diagnóstico do FIV pois, independente da fase clínica, ele detectará a infecção, evitando assim falsos negativos, servindo como teste de triagem para animais assintomáticos (portadores) e ajudando no controle epidemiológico dessa doença.

Objetivos:

Objetivos gerais:

-Definir a prevalência natural da infecção por FIV em gatos domésticos assintomáticos na região de Belém do Pará.

Objetivos específicos:

-Detecção do DNA proviral do vírus da imunodeficiência felina

-Análises de métodos diagnósticos

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Taxonomia

O Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (International Committee on Taxonomy of Viruses - ICTV), recentemente redefiniu-se a taxonomia dos retrovírus para reconhecê-la como uma família distinta. Exemplos desta família foram encontradas em peixes e insetos, mas a presença do vírus nesses animais ainda não foi incluída oficialmente. Essa família foi tradicionalmente dividida em duas subfamílias: *Orthoretrovirinae*, *Spumaretrovirinae*. A divisão foi baseada principalmente no mecanismo de patogênese. (ICTV, 2018).

Os vírus de transcrição reversa são atualmente classificados em cinco famílias: *Caulimoviridae*, *Hepadnaviridae*, *Metaviridae*, *Pseudoviridae* e *Retroviridae*. O FIV está na família dos *retrovirus*, no gênero *lentivirus* (quadro 1) a qual o HIV também pertence. Ambos os vírus causam imunossupressão e são vírus com longo período de incubação. (ICTV, 2018).

Quadro 1. Regras de nomenclatura para a classificação do FIV

CLASSIFICAÇÃO	
ORDEM	<i>Ortervirales</i>
FAMILIA	<i>Retroviridae</i>
SUBFAMILIA	<i>Orthoretrovirinae</i>
GENERO	<i>Lentivirus</i>
ESPECIE	<i>Feline Immunodeficiency virus</i>
ACRÓNIMO	FIV
NOME COMUM	Vírus da Imunodeficiência Felina

Fonte: ICTV (2018)

A enzima transcriptase reversa é uma enzima que produz DNA tendo como modelo o RNA viral. Esta enzima faz a transcrição reversa, o oposto do que ocorre em outras células, onde o RNA é produzido a partir de um DNA que lhe serve de modelo. À medida que sintetiza o DNA, a transcriptase reversa degrada o RNA modelo (BRANDÃO,2015).

Em seguida, a enzima produz uma cadeia de DNA complementar à que foi copiada da RNA viral, originando uma molécula de DNA de cadeia dupla. Esse DNA será utilizado para transcrever moléculas de RNA que atuam como mensageiras na síntese das proteínas virais.

O DNA produzido pela transcriptase reversa sintetiza também o RNA que constituirá o genoma dos novos vírus formados na célula infectada (BRANDÃO,2015). Esta subfamília de vírus inclui os seguintes gêneros: Alpharetrovirus, Betaretrovirus, Gammaretrovirus, Deltaretrovirus, Epsilonretrovirus, Lentivirus (como por exemplo o HIV) e Spumavirus. Nas últimas décadas, a família dos retrovírus têm sido um dos principais alvos de estudo dos cientistas por serem a causa de doenças graves em humanos, tais como, a síndrome da imunodeficiência adquirida. (TENÓRIO ET AL., 2016).

2.2. Replicação viral

Em 1964, Howard propôs um mecanismo de replicação, no qual alguns vírus (retrovírus) seguiam o fluxo de transmissão de informação: DNA → RNA → PROTEÍNAS, mas somente após o isolamento e a caracterização do DNA-polimerase RNA-dependente (RT), obtidos independentemente por Howard Temin e David Baltimore em 1970 é que esse mecanismo de transcrição reversa foi plenamente aceito. (VILLANOVA & LEAL, 2015).

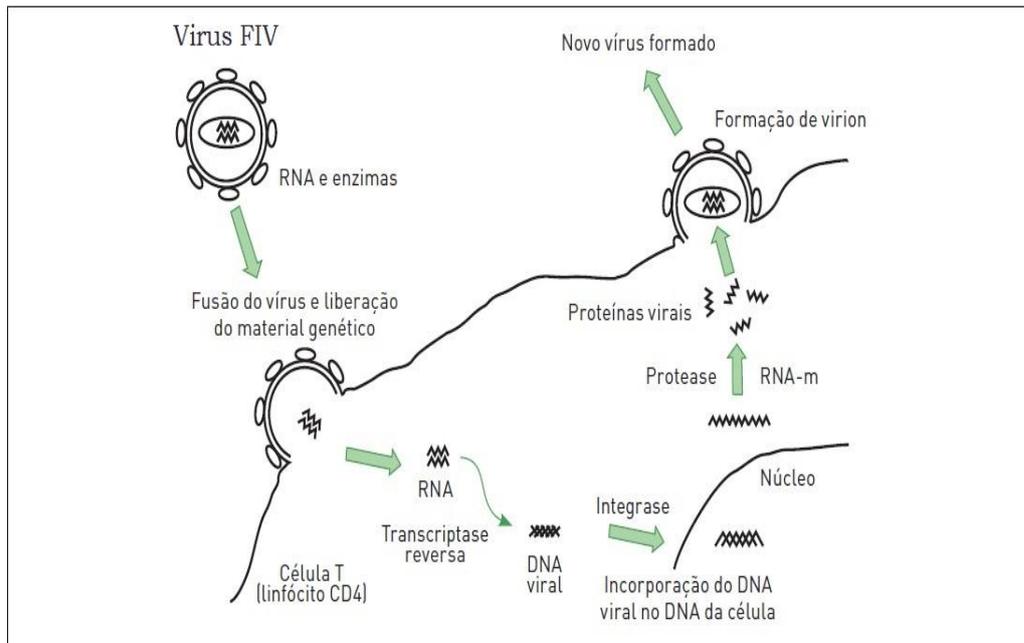
Os retrovírus apresentam duas fitas de RNA de polaridade positiva, mas o RNA genômico ao invés de ser traduzido pelos ribossomos, é convertido em uma molécula de DNA fita dupla, pela enzima transcriptase reversa presente nos vírions. Essa molécula de DNA (provírus) é integrada ao genoma da célula hospedeira (figura 1), e posteriormente transcrita pela RNA polimerase II. A transcrição resulta em mRNAs para a síntese de proteínas estruturais e da enzima TR, e em cópias do RNA genômico, que são então incluídos nas novas partículas víricas (KENYON & LEVER, 2011).

A estrutura do capsídeo que dá forma a partícula viral e cada gênero possui uma forma e característica que, no caso dos *lentivirus*, é cuneiforme. Por fim, o capsídeo é revestido por proteínas que formam o envelope do vírus. (VILLANOVA & LEAL, 2015). No genoma viral existem três genes principais:

- gag: codifica as proteínas do capsídeo
- polimerase: codifica as enzimas protease, transcriptase reversa e integrase
- envelope: codifica as proteínas externas que envolve a partícula viral

(VILLANOVA & LEAL, 2015).

Figura 1- Ciclo de vida resumido da replicação viral de retrovírus



Fonte: Cunico et al., 2008

No ciclo de replicação viral dos retrovírus, o agente entra na célula hospedeira e sofre um processo de transcrição reversa. O termo retro (reverso) reflete a propriedade que os retrovírus têm de sintetizar uma cópia de ácido desoxirribonucleico (DNA, do inglês “Deoxyribonucleic Acid”) a partir do RNA viral, por ação da enzima transcriptase reversa. O DNA sintetizado é integrado no genoma das células infetadas, por ação da enzima integrase, persistindo nelas como provírus. Ademais, o genoma viral é traduzido e transcrito e é efetuada a morfogênese de novos viriões que são extruzidos (Dunham & Graham, 2008).

2.3. Epidemiologia

O HIV tem distribuição mundial e assim como os outros membros desta família causam infecção persistente e provocam doenças crônicas como: tumores e imunossupressão em animais domésticos e selvagens (LAZO & TSICHILIS, 1990; HOSIE ET AL., 1990). A incidência destes vírus está diretamente relacionada com a densidade populacional.

A prevalência e incidência são variáveis entre as localizações geográficas e está relacionada ao estilo, idade, estado de saúde e gênero do animal (ALVES & REIS, 2012). Há estimativas de uma soroprevalência de 1-14% em gatos com sinais clínicos e até 44% em animais doentes (ALVES ET AL.,2011).

É importante conhecer a cadeia epidemiológica da doença para melhor promover medidas de controle ou erradicação e como fonte de infecção estão os felinos domésticos e selvagens, sendo classificados em doentes, portadores e reservatório, comumente o animal infectado pelo vírus da imunodeficiência felina apresenta-se assintomático, caracterizando-se como portador.(REFERENCIAR)

Dentre as vias de eliminação destacam-se a saliva, colostro, leite, transferência de sangue, assim como sêmen de animais infectados (ALLISON & HOOVER, 2003). A transmissão não costuma ser comum entre espécies diferentes (O'BRIEN ET AL., 2006). A transmissão horizontal acontece normalmente através de mordeduras, já que o vírus é eliminado em altas concentrações na saliva, que também contém leucócitos infectados (ALLISON & HOOVER, 2003).

A transmissão também pode ocorrer via transplacentária ou transmamária, em casos de fêmeas gestantes portadoras do vírus (GRACE, 2004). A porta de entrada pode ser a pele em casos de mordedura, bem como a mucosa vaginal em casos de cópula. Destacam-se como animais suscetíveis os felinos machos, adultos com livre acesso à rua e expostos a elevada densidade populacionais de gatos. (REFERENCIAR)

Ações profiláticas e de controle podem ser aplicadas para reduzir a ocorrência da doença, como castrar os felinos, isolar e tratar os doentes e como último recurso realizar a eutanásia dos animais infectados, desta forma reduzindo a possibilidade e propagação da doença. (REFERENCIAR)

2.4. Clínica

Devido sua característica imunossupressora, frequentemente a sintomatologia apresentada pelos animais infectados pelo FIV não é resposta direta da ação viral, mas resultado de infecções oportunistas instaladas devido a debilidade do sistema imune do hospedeiro.

Na fase inicial da infecção pelo FIV, manifestações como febre, linfadenopatia e sinais vagos de comprometimento sistêmico como anorexia e depressão podem ser observadas, persistindo por algumas semanas e desaparecendo na longa fase crônica da infecção. Apenas a linfadenopatia pode persistir por todo o período de infecção,

indicando hiperplasia linfoide como resposta à infecção. A alteração hematológica mais evidente na fase aguda da infecção é a neutropenia. (TEIXEIRA, B.M. ET AL., 2010).

Os sinais clínicos geralmente regridem em 1 a 4 meses após a infecção, concomitante à soroconversão, e um estágio latente de duração variável ocorre quando a carga viral alcança estadió estável. A doença no estágio final geralmente não ocorre por vários anos pós-infecção, e é marcada pela perda de imunócitos CD4 e alta carga viral circulante. Sinais clínicos relatados durante esta fase da doença inclui manifestações neurológicas, susceptibilidade a infecções oportunistas e neoplasia (RAVI ET AL., 2010).

Os sinais clínicos normalmente são consequência de infecções oportunistas, neoplasias e/ou mielossupressão que são comuns ao longo do desenvolvimento da doença. Hartmann (2012) observou que, enquanto os felinos infectados por FELV tem 62 vezes mais chance de desenvolverem linfomas (figura 2) ou leucemia por ação direta do vírus quando comparados com os animais soronegativos, os felinos infectados por FIV têm um risco cinco vezes maior de desenvolvimento de tumores pela ação normalmente indireta do vírus.

Figura 2- foto representativa de linfoma em felino



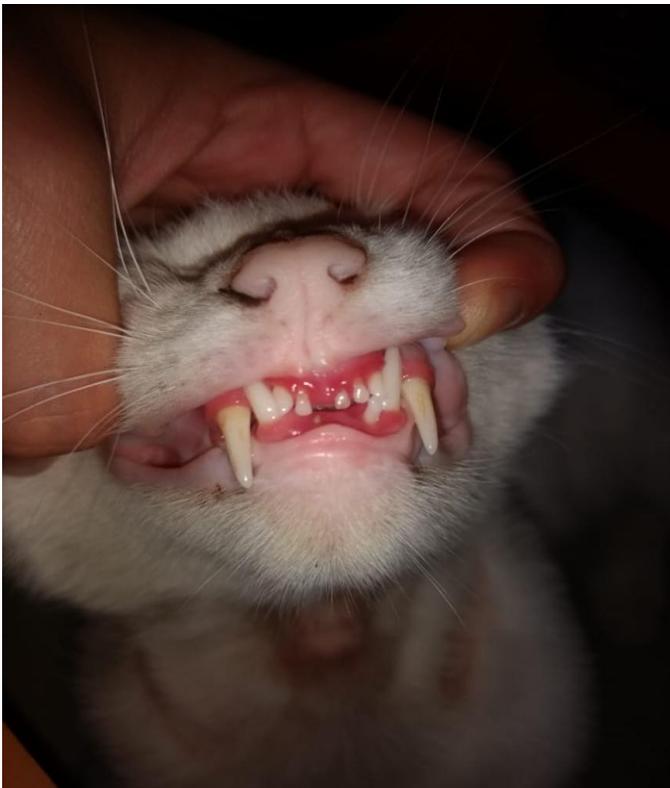
Fonte: As autoras

A imunossupressão característica da doença é resultado da alteração progressiva dos tecidos linfóides com depleção tímica, hiperplasia linfoide, plasmocitose e finalmente depleção linfoide (GRANT ET AL., 2009). Essas alterações são responsáveis pela diminuição de células CD4+ e linfócitos T no sangue periférico (RAVI, 2010). Há também alteração da função dos macrófagos e mudanças no perfil de citocinas (BARR ET AL., 2000).

Essas ações se devem à interação do vírus com receptores específicos celulares e, de acordo com Dunham e Graham (2008), pode-se afirmar que em relação aos receptores celulares, assim como o vírus da imunodeficiência humana, o vírus da FIV necessita de receptores primários e secundários. O receptor primário é o CD134, que é expressado nos linfócitos T CD4+, nos linfócitos B e macrófagos ativados. O receptor secundário é o CXCR4, um receptor de quimiocitocina, que é análogo ao utilizado pelo vírus HIV.

Gengivite-estomatite crônica é uma das alterações mais comuns apresentadas pelos pacientes infectados (Figura 3). Em casos raros, o vírus pode causar distúrbios neurológicos (HOSIE et al., 2009). As manifestações neurológicas descritas nos animais infectados incluem alterações de comportamento, alteração nos padrões de sono, dificuldade de aprendizado, convulsões, alterações eletroencefalográficas e paresias (TENORIO et al., 1991). Alterações renais envolvendo lesões glomerulares e tubulointersticial associadas a severa proteinúria são frequentes nos gatos positivos para o FIV na última fase da doença. Essas lesões renais são possivelmente causadas pelo próprio vírus e pela deposição de imunocomplexos nas estruturas glomerulares dos animais persistentemente infectados (MATSUMOTO et al., 1997).

Figura3: Foto representativa de animal com gengivite crônica



Fonte: As autoras

2.5. Diagnóstico

O kit rápido de ELISA é amplamente utilizado na prática do médico veterinário para detecção de anticorpos, no caso da FIV, e do antígeno, no caso da FeLV devido a sua praticidade. Segundo o laboratório que confecciona o teste e alguns estudos acadêmicos (SAND et al., 2010).

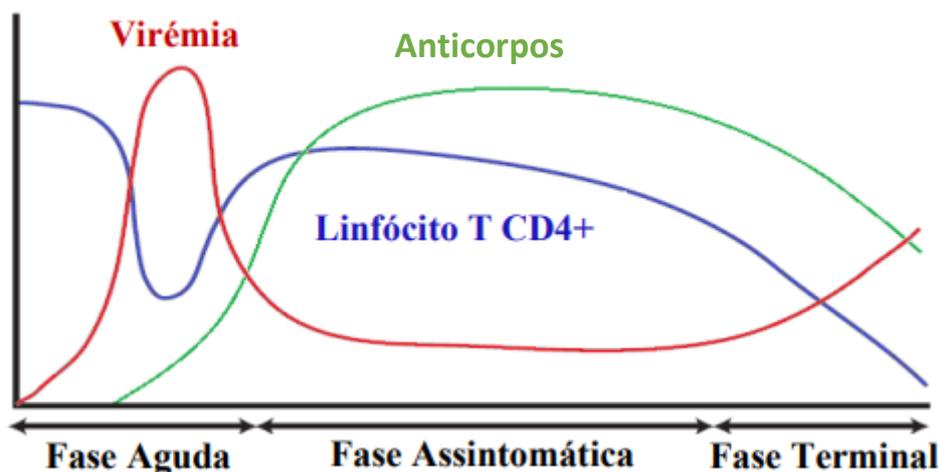
Independentemente do subtipo de FIV, o teste de ponto de atendimento para identificar anticorpos dirigidos contra o FIV tem sido a base do teste de diagnóstico por mais de 20 anos, complementado por análise de Western blot e isolamento de vírus em ambientes de pesquisa. A técnica de Western blot (WB) é um teste sorológico considerado como “gold standard” e é utilizado para confirmar resultados inconclusivos (DUNHAM & GRAHAM, 2008). O FIV purificado é separado por eletroforese permitindo a exposição das suas proteínas estruturais facilitando a detecção de Ac contra cada proteína do FIV (HOSIE et al., 2009).

Kits de teste de ponto de atendimento são baratos, fáceis de usar e diagnosticar de forma confiável a infecção pelo FIV em gatos não vacinados com FIV (ISHIDA et al., 1989). Existe uma variação entre os kits de testes de anticorpos disponíveis comercialmente na metodologia e o antígeno viral alvo para detecção de anticorpos.

SNAP FIV / FeLV Combo2 é um kit de ensaio imunoenzimático de fluxo lateral (ELISA) que detecta anticorpos para p15 (proteína de matriz) e p24 (proteína de capsídeo), Witness FeLV / FIV3 é um kit de imunocromatografia de fluxo lateral que detecta anticorpos para gp40 (glicoproteína transmembrana), enquanto que o Anigen Rapid FIV / FeLV4 é um kit de imunocromatografia de fluxo lateral que detecta anticorpos para p24 e gp40. (KENNEDY, 2015).

O diagnóstico rotineiro da infecção com o FIV baseia-se na detecção do anticorpo específico para o vírus. A triagem rápida para o antígeno viral não é possível, pois a quantidade de vírus circulante é baixa após o estágio agudo da infecção (gráfico 1). O FIV produz uma infecção persistente que dura o resto da vida; desse modo, a detecção de anticorpos é suficiente para o diagnóstico se o gato não tiver sido vacinado contra o FIV. De início, a detecção de anticorpos específicos para o FIV é feita com kits de ELISA ou imunocromatografia (figura 4). (BAAR et al., 1996).

Gráfico 1- Evolução temporal da infecção por FIV, adaptado



Fonte: Dunham & Graham (2008).

Com esses kits, a maioria dos gatos terá anticorpo contra o FIV detectável 60 dias após a infecção, mas em alguns gatos a soroconversão demora até 4 meses para acontecer. (BAAR et al., 1996). A comparação de diversos kits diagnósticos comercializados indica sensibilidade e especificidade altas, bem como valores preditivos negativos e positivos significativos (> 90%) em gatos sem história de vacinação contra o FIV. (LEVY et al., 2004).

Figura 4 - kit de teste imunocromatografia, (ALERE) FIV FELV



Fonte: As autoras

Filhotes de gatas infectadas ou vacinadas contra o FIV podem adquirir anticorpos contra o vírus a partir do colostro. Em um estudo feito com esse tipo de filhotes, os anticorpos contra o FIV persistiram até depois da 8ª semana de idade em mais de 50% daqueles (n = 55) de gatas vacinadas contra o FIV (n = 12), mas não foram mais

detectáveis na 12^a semana. (MACDONALD et al., 2004). Em outro estudo, a quantidade de anticorpos adquiridos de maneira passiva em cinco filhotes de gatas infectadas só caiu para níveis não detectáveis quando eles tinham cerca de 17 semanas de idade. (PU et al., 1995).

Nenhum dos métodos rotineiros de teste é capaz de distinguir os anticorpos adquiridos da mãe daqueles produzidos por filhotes infectados; portanto, filhotes com menos de 6 meses de idade positivos ao teste realizado com esses ensaios devem ser testados novamente quando perderem os anticorpos maternos. Por exemplo, os filhotes podem ser testados novamente a intervalos de 30 dias até serem negativos para o anticorpo contra o FIV. Embora a infecção de filhotes, mesmo os de gatas infectadas, seja incomum, deve-se pressupor que um filhote com teste positivo é contagioso até obter-se um resultado negativo. Filhotes com mais de 6 meses de idade e anticorpos contra o FIV são mais propensos a infectar-se.

Devido às dificuldades para detectar anticorpos contra o FIV adquiridos de maneira passiva, é melhor fazer o teste em filhotes apenas a partir dos 6 meses de idade. Como constituem um grupo de baixo risco, a maioria dos filhotes tem resultado negativo e pode ser considerada sem a infecção. No entanto, filhotes infectados podem ser uma fonte de infecção para outros gatos se não forem identificados e isolados. Em um estudo publicado, poucos proprietários e veterinários seguiram as recomendações para teste retroviral, de modo que adiar o teste em filhotes recém-adquiridos até que tenham 6 meses de idade pode acabar fazendo com que muitos gatos nunca sejam testados para o FIV. 95 (GOLDKAMP et al, 2008).

Porém, estes testes estão predispostos a resultados falso negativos que podem ocorrer devido ao início da infecção, quando gatos se tornam provirus positivos mas ainda não fizeram a soroconversão. Nas fases terminais da doença, devido a imunodeficiência e quando altas concentrações do vírus do sangue levam ao sequestro de anticorpos anti-FIV em complexos imunes. (HOSIE et al., 2009).

A técnica de PCR permite detectar RNA viral e DNA de provírus, apresentando, contudo, sensibilidade e especificidade muito variáveis, de 40 a 100% (SELLON & HARTMANN, 2012) e deve ser usada como teste de confirmação em gatos que previamente testaram positivo na pesquisa de anticorpos. (GRACE, 2011). Nos casos em que o animal está infetado, mas a resposta imunitária é muito discreta, a PCR torna-se um método de diagnóstico particularmente útil (SELLON & HARTMANN, 2012).

Em determinadas situações, quando a carga viral está abaixo do limiar de detecção, o número de células infectadas na amostra é demasiado pequeno ou os ‘primers’ não reconhecem a estirpe ou subtipo em questão, ocorrem falsos-negativos (GRACE, 2011).

2.6. Tratamento

O tratamento na maioria das vezes é de suporte e dirigido contra as condições mórbidas associadas, concomitantes ou subjacentes. A gengivite/estomatite crônica pode requerer o uso de antiinflamatórios esteroides ou ainda de fármacos imunossupressores, porém seu uso é bastante controverso, devido aos efeitos colaterais que apresentam (BAAR et al, 2000). Nas formas mais graves e refratárias aos tratamentos instituídos, recomenda-se a extração de todos os dentes.

A variabilidade genética do FIV possibilita uma acelerada adaptação ao sistema imune do animal e aos fármacos antirretrovirais, sendo essas características mecanismos de escape do vírus (ROBERTS ET AL., 1998).

A partir disto, faz-se necessário o desenvolvimento de um protocolo HAART, consiste na associação de fármacos antirretrovirais visando a supressão da fase crítica de alta replicação viral, conhecido como coquetel, para felinos infectados, uma vez que minimizaria a ocorrência de resistência ao tratamento. Além disso, a terapia antirretroviral combinada de alta potência reduz a morbidade e mortalidade dos pacientes infectados, melhora a qualidade de vida, favorece a recuperação do sistema imunológico e resulta em supressão sustentada da replicação viral, levando em consideração aspectos como período de tratamento, efeitos adversos entre outros critérios para o melhor manejo terapêutico (SILVA ET AL., 2016).

O antirretroviral zidovudina (análogo da timidina que bloqueia a transcrição reversa) e lamivudina (análogo de nucleosídeo) demonstraram atividade antiviral *in vivo* diante do FIV e encontram-se disponíveis no Brasil, porém o uso desses fármacos em felinos é restrito a projetos de pesquisa, sendo vedada pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) a prescrição dessa classe de medicamentos por médico veterinário (SILVA ET AL., 2016).

Entretanto, há trabalhos que demonstram respostas ineficazes com o uso de retrovirais a exemplo da administração do raltegravir na dose de 40mg/ gato a cada 12 horas, via oral, durante 21 dias, não demonstrando atividade antirretroviral em gatos naturalmente

infectados pelo HIV, pois não foi capaz de promover supressão de carga viral plasmática, bem com o aumento da contagem de células alvo (linfócitos T CD4+) (SILVA, 2017).

Outra alternativa são os imunomoduladores e estimulantes da produção de interferon, proteínas reguladoras da resposta imunitária do hospedeiro. Um contraponto nesta terapêutica é a possibilidade de resposta reversa, ocorrendo um aumento da carga viral em decorrência da estimulação de células infectadas (AZEVEDO, 2011).

3. MATERIAL E METODOS

3.1. Amostras

Foram coletadas 50 amostras de sangue de gatos domésticos (*Felis catus*) oriundos do projeto Vida Digna da Ufra que estavam clinicamente saudáveis para serem submetido ao procedimento de castração. Destes 29 eram fêmeas e 21 machos. Os animais foram escolhidos aleatoriamente, sendo de qualquer idade, raça ou sexo. As amostras foram coletadas para uma pesquisa anterior aprovada pelo Comitê de Ética da UFRA com protocolo nº 048/2017 (Anexo 1) no período de novembro a dezembro de 2017.

As amostras de sangue foram coletadas por venopunção da jugular, de forma asséptica para armazenamento de 1-2 mL de sangue total em tubo estéril contendo anticoagulante EDTA (Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético) para imediata realização do hemograma e posteriormente armazenada em ultra freezer -80 °C até o momento da análise molecular.

3.2. Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada através da utilização de um kit comercial (Pure Link[®] Genomic DNA Mini Kit) de acordo com as recomendações do fabricante. O DNA foi eluído em 50µl de tampão de eluição que acompanha o kit e foi armazenado no ultra freezer -80°C. O DNA extraído foi conferido em gel de agarose a 1,5% e corado em Sybr safe para verificar a integridade.

3.3. Processamento PCR

O DNA total extraído do sangue foi submetido à nested-PCR para investigar a presença de DNA viral. As reações de PCR foram realizadas utilizando dois conjuntos de primers correspondentes às posições 917 e 1628 (primers FIV PCR S 2 e FIV PCR A 2) e 1036-1364 (primers FIV NESTED S e FIV NESTED A) da região P17-P24 do Gene gag de FIV (HOHDATSU et al., 1998). Os primers externos (FIV PCR S 2 e FIV PCR A 2) usados na primeira reação foram: frente, 5 'AAT ATG ACT GTA TCT ACT GC 3', e reverso, 5 'TTT TCT TCT AGA GTA CTT TCT GG 3'. Os primers internos (FIV NESTED S e FIV NESTED A).

Na segunda reação foram: frente, 5 'TAT TCA AAC AGT AAA TGG AG 3', e reverso, 5 'CTG GTT GTT CTT GAG TT 3'. A primeira reação de PCR amplifica um fragmento de DNA de 658 pb e a segunda reação resulta em um amplicon de 329 pb. Os primers foram escolhidos após a comparação cuidadosa de pelo menos 10 sequências dos

diferentes subtipos de FIV publicados no GenBank (números de acesso ao GenBank: FIV-A [M25381, D37820, M36968], FIV-B [M59418, D37821], FIV-C [AY369384], U02397], FIV-D [D37818, D37822] e FIV-E [AJ304961], utilizando o software MEGA v.3.1 para Windows (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) como previamente descrito (KUMAR ET AL., 2004).

As reações foram realizadas em um volume total de 25µl. A primeira reação com: 12,8 µl de água purificada; 2,5 µl de bf; 2,0 µl DNTP; 1,5 µl Cl₂Mg; 1,5 µl de cada iniciador; 0,2 de Taq DNA polimerase (Invitrogen®) e 3,0 µl do DNA molde.

Na segunda reação: 17,05 µl de água purificada; 2,5 µl de bf; 1,0 DNTD; 0,75 µl MgCl₂; 1,0 µl de cada iniciador; 0,2 µl de Taq DNA polimerase (Invitrogen®) e 1,5 µl do DNA molde.

As reações de amplificações foram realizadas em um termociclador programável. (Biosystems). Os ciclos padronizados para amplificação do DNA foram realizados com base nos descritos por Hohdatsu et al. (1992): uma incubação inicial a 94°C por 5 minutos, seguida de 30 ciclos, cada uma consistindo de desnaturação a 94°C por 60 segundos, hibridização a 55°C por 60 segundos e extensão pela polimerase a 72°C por 120 segundo. Após 30 ciclos ocorreu a extensão final a 72°C por 5 minutos finalizando a 25°C ∞.

Como controle positivo foi utilizado em cada uma das reações uma amostra previamente identificada como positiva para FIV específico e como controle negativo foi utilizado água bidestilada estéril.

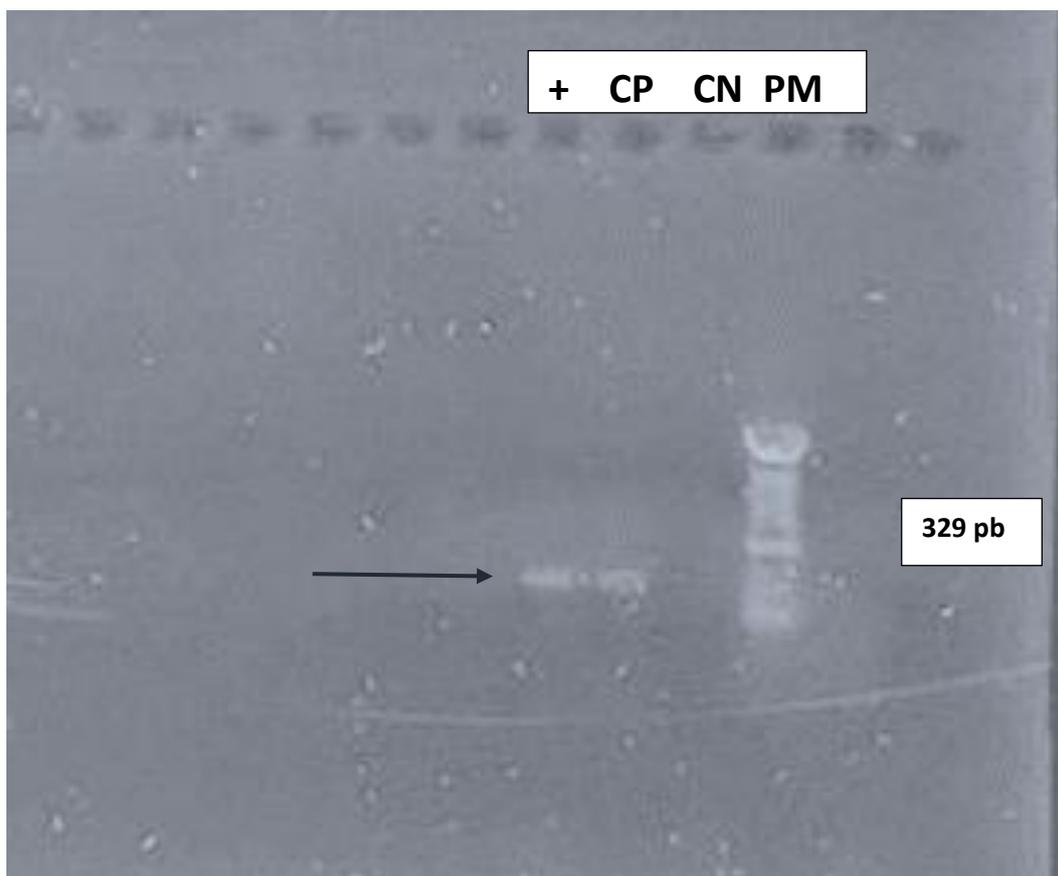
3.4. Eletroforese em gel de agarose para visualização do fragmento amplificado

O produto resultante da PCR foi adicionado e analisado em gel de agarose a 1,5%, corado em Sybr safe e submetido à eletroforese a 100V durante com tampão TAE a 30 minutos. Depois foi realizada a leitura em um transluminador de luz ultravioleta. O tamanho do fragmento amplificado (329bp) foi estimado comparando-se com os marcadores de peso molecular 100 pb e/ou 1 Kb (DNA ladder Invitrogen®).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das amostras analisadas apenas em uma foi amplificado o provirus. Na figura 5 pode-se observar o resultado da segunda amplificação para o gene gag do FIV, com banda na altura de 329 pb da PCR.

Figura 5 Foto em gel de agarose a 1,5% sob luz ultravioleta mostrando os resultados das amplificações do gene gag do FIV em amostras de sangue de felinos.



Este índice (figura 5) está em concordância com valores encontrados por Bisol (2016) que obteve 3,38% (Hospital Veterinário do Rio Grande do Sul) positivos para FIV de um total de 177 animais analisados pela amplificação de DNA próviral mediado pela polimerase e um estudo realizado por Marçola (2011) com 200 amostras de gatos em diferentes localidades do Distrito Federal onde apenas 2% foi positiva entretanto, a frequência do vírus do FIV é bastante variável em regiões e condições nas quais o animal possa estar mais predisposto a contaminar-se.(HARTMANN, 2015).

Comparando este resultado a outros estudos, principalmente onde o número amostral era de gatos clinicamente doentes (independente da doença) como o realizado na Argentina nos anos de 2009-2013 onde 20,34% (52-255) foram positivos em teste N-PCR e um estudo realizado por Caldas (2000) no Rio Grande do Sul de 40 amostras de animais suspeitos obteve-se 37,5% foram positivos, afirmando assim, a maior prevalência em animais sintomáticos.

As taxas da infecção pelo FIV entre os gatos domésticos assintomáticos variam de 1 a 14%, de acordo com as diferentes regiões, idade, sexo e risco de exposição

(BACHMANN et al., 1997). A taxa de infecção é cerca de duas vezes maior entre os gatos doentes, comparada com a dos felinos assintomáticos (HARTMANN et al., 1998).

Em afirmação a essa linha de raciocínio, um estudo realizado em São Paulo (1997) analisaram-se 401 animais para detecção do anticorpo do vírus da imunodeficiência felina (FIV) - CITE ®. Desta amostra 14% dos animais doentes apresentaram-se positivos para o vírus contra 6,5% de animais assintomáticos.

Quanto ao sexo, há maior prevalência em animais machos não castrados (Souza & Teixeira, 2003) devido ao provável comportamento agressivo visto que o FIV é transmitido primariamente por inoculação parenteral de vírus existente na saliva ou no sangue (HARTMANN, 2015). Felinos machos, de acordo com Fernandes (2015), têm um risco de contágio 2,8 vezes maior que fêmeas nas mesmas situações. Em relação a idade, a infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Felina está relacionada a animais mais velhos devido a doença ser de curso lento, ter uma fase crônica (assintomática) de tempo variável, de manifestações clínicas tardias e que pode persistir por anos podendo não causar o óbito do animal (HARTMANN et al., 2012). Porém o resultado deste trabalho é contrastado a esses estudos, visto que o único animal positivo era fêmea (Anexo 2) com menos de 2 anos de idade. Esse resultado também poderia ser explicado devido ao número amostral ter sido maior para fêmeas do que para machos (29/21).

Vários fatores podem influenciar os resultados desses estudos como localização, fase clínica da doença, escolha do teste utilizado, procedência dos animais. As nossas amostras analisadas foram de animais previamente selecionados para cirurgia de castração (Projeto Vida digna) e apresentavam-se clinicamente saudáveis para a posterior coleta do sangue e este também foi um dos motivos para a escolha da detecção do DNA proviral, pois no início da infecção, antes do aparecimento dos primeiros sinais inespecíficos e a soroconversão um teste baseado na detecção indireta pode apresentar-se negativo.

a sensibilidade e especificidade de um teste PCR pode ser aperfeiçoado quando se utiliza a nested PCR, ou seja, a primeira amplificação é realizada utilizando um par de oligonucleotídeos externos, seguida por uma segunda amplificação usando um par de oligonucleotídeos internos (ARJONA et al.; 2007) e desta forma há ganhos quanto à especificidade e à quantidade do material amplificado (LEAL & RAVAZZOLO, 1998).

A PCR para diagnóstico do FIV tem grande destaque na medicina veterinária pois testes sorológicos podem não detectar os anticorpos, visto que existe o período denominado janela imunológica que compreende o início da infecção até a presença de

anticorpos circulantes e a fase terminal na qual ocorre depleção nos níveis de anticorpos. Além disso é possível ocorrer falso-positivos em filhotes onde as mães sejam positivas para o vírus. Estes casos onde o animal possa negativar em testes sorológicos, a PCR pode detectar DNA proviral (DANDEKAR et al. 1992).

5. CONCLUSÃO

Apesar de uma baixa ocorrência encontrada no grupo de animais testados, sendo estes assintomáticos, confirmou-se a presença do vírus na cidade de Belém, dessa forma demonstrando a importância de testar os felinos mesmo sendo assintomáticos. Faz-se necessário a realização de trabalhos futuros que amplie o número amostral, compare métodos diagnósticos, analise sinais clínicos, procedência e estilo de vida dos animais

testados para assim elucidar o perfil epidemiológico da doença na região de Belém do Pará, levando em consideração a relevância clínica desta infecção e a correta conduta médica veterinária para evitar novas infecções.

6. REFERÊNCIA

ADAM, F.; DANDRIEUX, J. **Diagnostic testing for detection of feline retroviruses.** In Practice, v. 33, p .498–506, 2011.

ALLISON, R.W.; HOOVER, E.A. **Covert vertical transmission of feline immunodeficiency virus.** AIDS Research and Human Retroviruses, v. 19, p. 421-434, 2003.

ALVES F, Rajão DS, Del Puerto HL, Braz GF, Leite RC, Mazur C, et al. **Occurrence of feline immunodeficiency virus and feline leukemia virus infection in cats.** Am J Anim Vet Sci. 2011; 6:125-9,

ALVES F, Reis JKP. **Feline immunodeficiency.** In: Metodiev K. Immunodeficiency. Rijeka: In Tech; p.357-74, 2012.

ARJONA, A., BARQUERO, N., DOME'NECHE, A., TEJERIZO, G., COLLADO, V.M., TOURAL, C., MARTIN, D., GOMEZ-LUCIA E. 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**, v9, p. 14-22, 2007.

AVERY, P.R. **Feline immunodeficiency virus.** In: LAPPIN, M.R. Feline internal medicine secrets. Philadelphia: Hanley e Belfus, 2001.

AZEVEDO, i.R.p.s, **terapêutica com interferão- ω em gatos infectados pelo vírus da imunodeficiência felina e/ou pelo vírus da leucemia felina:** avaliação clínica, análises laboratoriais e excreção de vírus concomitantes do tracto digestivo,2011.

BACHMANN, M. H. ; MATHIASON-DUBARD, C. ; LEARN, G.. ; RODRIGO, A. G. ; SODORA, D. L. ; MAZZETTI, P. ; HOOVER, E. A. ; MULLINS, J. I. Genetic diversity of feline immunodeficiency virus: dual infection, recombination, and distinct evolutionary rates among envelope sequence clades. **Journal of Virology**, v. 71, n. 6, p. 4241- 4253, 1997.

BARR MC: FIV, FeLV, and FIPV: **interpretation and misinterpretation of serological test results**, Semin Vet Med Surg (Small Anim) 11:144, 1996.

BARR, M.C.; PHILLIPS, T.R. VIF e Doença Relacionada. In: ETTINGER, S.J e FELDMAN, EC. **Tratado de medicina interna veterinária.** 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap.90.p.456-462. 2008.

BARR, Margaret C et al. Exogenous glucocorticoids alter parameters of early feline immunodeficiency virus infection. **The Journal of Infectious Disease**, v. 181, p. 576-586, 2000.

BISOL,j., Avaliação da concordância dos resultados da técnica de PCR e da técnica de imunodifusão rápida para o diagnóstico do vírus da imunodeficiência felina (FIV) e da leucemia felina (FeLV) em amostras de sangue de gatos atendidos no Setor de Medicina Felina do HCV/ UFRGS, 2016.

BRANDÃO,R.E.L. **Vírus e Retrovírus, Contributo para a Evolução das Espécies**, Universidade Fernando Pessoa, Faculdade de Ciências da Saúde,2015.

CALDAS,A.P.F. & al, Detecção do provírus da Imunodeficiência Felina em gatos domésticos pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase, 2000.

CUNICO, Wilson; GOMES, Claudia R. B e JUNIOR Walcimar T. Vellasco. HIV – **recentes avanços na pesquisa de fármacos**. Vol. 31, No. 8, 2111-2117, 2008.

DANDEKAR S., Beebe A.M., Barlough J., Phillips T., Elder J., Torten M. & Pedersen N. 1992. **Detection of feline immunodeficiency virus (FIV) nucleic acids in FIV-seronegative cats**. J. Virol. 66:4040-4049. Diseases of the Dog and Cat (4th ed.). Elsevier Health Sciences.

DUNHAM, Stephen P.; GRAHAM, Elizabeth. **Retroviral Infections of Small Animals**. The Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice, v. 38, n. 4, p.879-901, 2008.

FERNANDES, Ana Patrícia Rocha Pimenta. **Prevalência do Vírus da Imunodeficiência Felina (FIV) e do Vírus da Leucemia Felina (FeLV) e Fatores de Risco associados à seropositividade em gatos domésticos do Distrito de Lisboa**. 2015. 82 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Medicina Veterinária, Universidade de Trás-os-montes e Alto Douro, Lisboa, 2015;

GOLDKAMP CE, Levy JK, Edinboro CH et al: Seroprevalences of feline leukemia virus and feline immunodeficiency virus in cats with abscesses or bite wounds and rate of veterinarian compliance with current guidelines for retrovirus testing, J Am Vet Med Assoc 232:1152, 2008.

GRACE, S. F. **Feline immunodeficiency virus infection**. In **The Feline Patient** (4th ed, pp. 179–180). John Wiley & Sons,2011.

GRACE, S.F. **Infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Felina**. In: NORSWORTHY, G.D. O Paciente Felino: tópicos essenciais de diagnóstico e tratamento. São Paulo: Manole, 2004. P.244-247.

GRANT, C. K. et al. 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, v. 106, n. 47, p.19980-19985, 2009.

HARTMANN, K. Efficacy of antiviral chemotherapy for retrovirus-infected cats. **Journal of Feline Medicine and Surgery** v. 17, p. 925–939, nov. 2015.

HARTMANN, K. **Feline immunodeficiency virus infection**: an overview. *Veterinary Journal*, v. 155, n.2,p.123-137,1998.

HARTMANN, Katrin. **Clinical Aspects of Feline Retroviruses: A Review**. *Viruses*, v. 4, n. 12, p.2684-2710, 2012.

HOSIE, Margaret J. et al., **Feline Immunodeficiency: ABCD Guidelines on Prevention and Management**, **Journal of Feline Medicine and surgery**,11,575-584, doi.org/10.1016/j.jfms.2009.05.006, 2009.

HOHDATSU, T.; YAMADA, M.; OKADA, M.; HOHDATSU, T.; YAMADA, M.; OKDADA, 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**, v.30, p.113-123, 1992.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, banco de dados disponível em <<https://www.ibge.gov.br/>>. Acesso: 30 outubro.2018.

ISHIDA T., Washizu T., Toriyabe K., Motoyoshi S., Tomoda I. & Pedersen N.C. 1989. **Feline immunodeficiency virus infection in cats of Japan**. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 194:221-225.

KENYON, J. C.; LEVER, A. M. L. **The molecular biology of feline immunodeficiency virus**. *Viruses*, n. 3, p. 2193-2213, 2011;

KUMAR, S. et al. **MEGA3: software integrado para análise de genética molecular evolutiva e alinhamento de seqüências**. *Breve Bioinform.* v.5, p.150-163, 2004.

LAZO P.A; Tschilis P.N. **Biology and pathogenesis of retroviruses**. *Semin Oncol.* 1990;17: 269-94.

LEAL E. & RAVAZZOLO A.P. 1998. **Detecção do vírus da imunodeficiência felina (FIV) em felídeos selvagens pertencentes à região neotropical, através da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR)**. *Hora Vet.*, Porto Alegre, 101:57-60.

LEVY JK, Crawford PC, Slater MR: Effect of vaccination against feline immunodeficiency virus on results of serologic testing in cats, *J Am Vet Med Assoc* 225:1558, 2004.

MACDONALD K, Levy JK, Tucker SJ et al: Effects of passive transfer of immunity on results of diagnostic tests for antibodies against feline immunodeficiency virus in kittens born to vaccinated queens, *J Am Vet Med Assoc* 225:1554, 2004.

MARÇOLA, t. Estudo da avaliação laboratorial e ocorrência da infecção pelo vírus da imunodeficiência felina e co-infecções em felinos domésticos de diferentes localidades do distrito federal. Universidade de Brasília, 2011.

MATSUMOTO, H. ; TAKEMURA, N. ; SAKO, T. ; KOYAMA, H. ; MOTOYOSHI, S. ; INADA, Y. Serum concentration of circulating immune complexes in cats infected with feline immunodeficiency virus detected by immune adherence hemagglutination method. *Journal of Veterinary Medical Science*, v. 59, n. 5, p. 395- 396, 1997.

NOVO,S.G. & al,Criterios diagnósticos para la infección por el virus de la inmunodeficiencia felina y el virus de la leucemia felina en gatos domésticos de Buenos Aires, Argentina,Revista Argentina de Microbiología Volume 48, Issue 4, outubro-dezembro 2016, Pag 293-297.

Pu R, Okada S, Little ER et al: Protection of neonatal kittens against feline immunodeficiency virus infection with passive maternal antiviral antibodies, *AIDS* 9:235, 1995.

RAVI, Madhu et al. Naturally acquired feline immunodeficiency virus (FIV) infection in cats from western Canada: prevalence, disease associations, and survival analysis. *Canadian Veterinary Journal*, v 51, p. 271-276, 2010.

RECHE JR, A.; HAGIWARA, M. K.; LUCAS, S.R R. Clinical study of acquired immunodeficiency syndrome in domestic cats in São Paulo. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science** v. 34, p; 152-155, 1997.

ROBERTS, J. D.; BEBENEK, K.; KUNKEL, T. A. The accuracy of reverse transcriptase from HIV.*Science*, v. 242, n. 4882, p. 1171-1173, 1998.

SAND, C., et al. Evaluation of a new in-clinic test system to detect feline immunodeficiency virus and feline leukemia virus infection. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 39, n. 2, p. 210–214, 2010

SCHMITT A.C., Reischak D., Cavlac C.L., Monforte C.H.L., Couto F.T., Almeida A.B.P.F., Santos D.G.G., Souza L., Alves C. & Vecchi K. 2003. **Infecção pelo vírus da leucemia e da peritonite infecciosa felina em felídeos selvagens de vida livre e de cativeiro da região do pantanal mato-grossense**. *Acta S. Vet.* 31:185-188.

SELLON, R. K., & Hartmann, K. **Feline Immunodeficiency Virus Infection**. In Infectious. In: Greene CE ,2012.

SILVA, f.s., SILVA, d.s.; VARGAS, g.d.; FISCHER, g.; LIMA, m.; HÜBNER, s.o., **Terapia Antirretroviral no Controle do Vírus da Imunodeficiência Felina**, 2017.

SOUZA, H.J.M.; TEIXEIRA, C.H.R. **Medicina e Cirurgia Felina**. Rio de Janeiro: Ed. Lf Livros, 475p, 2003.

TEIXEIRA,B.M. et al: **vírus da imunodeficiência felina uma atualização, Clínica Veterinária**, n. 88, p. 54-66, 2010.

TENÓRIO, L. Z. et al. (2008). A Potencialidade dos Lentivectores na Terapia Gênica. **Rev Bras Clin Med**, 6, pp. 260-267. Terapia antirretroviral no controle da infecção pelo vírus da imunodeficiência felina: revisão e perspectivas, **SCIENCE AND ANIMAL HELATH**, V.4 N.3 P. 268-282, 2016;

VILLANOVA, Fabíola Elizabeth & LEAL, Elcio. **Tratado de Medicina Veterinária Interna de Cães e Gatos: Retrovírus vol 1**. Rio de Janeiro: Gen Roca, 2015. cap 98. Pag 852.

7. ANEXOS

1. Certificado autorização CEUA



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

CERTIFICADO

Certificamos que o **Projeto de Pesquisa**, intitulado **“Ocorrência de Micoplasmas hemotrópicos em felinos domésticos (*Felis catus*)”**, protocolo nº **048/2017** (CEUA) e 23084.016900/2017-48 (UFRA), sob a responsabilidade do **Prof. Dr. Alexandre do Rosário Casseb** – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, Subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de **PESQUISA** – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS da Universidade Federal Rural da Amazônia, na reunião de **13/11/2017**.

Vigência do projeto	13 de novembro de 2017 a 13 de novembro de 2019
Espécie/linhagem	<i>Felis catus</i> (gato) / SRD
Número de animais	400 (quatrocentos) animais
Peso/Idade	Aprox. 2kg / acima de 6 meses
Sexo	200 Machos e 200 Fêmeas
Origem	Clínicas e hospitais veterinários da Região Metropolitana de Belém

Belém, 11 de dezembro de 2017.

2. ANIMAIS SELECIONADOS PARA A VERIFICAÇÃO DO DNA PROVIRAL DO FIV

Nº	Sexo	PLAQUETAS	VALOR	LEUCOCITOS	VALOR	IDADE	
1	F	Normal	360	Linfopenia	1168	1a 7m	N
2	F	Trombocitopenia	130	Normal	4366	3a	N
3	F	Normal	340	Normal	4715	11m	N
4	F	Trombocitopenia	200	Normal	2450	10m	N
5	M	Normal	373	Normal	4864	1a	N
6	F	Normal	385	Linfocitose	13566	8m	N
7	M	Normal	364	Normal	3360	2a	N
8	F	Normal	608	Normal	6424	S/I	N
9	M	Trombocitopenia	229	Linfocitose	8832	1a	N
10	F	Trombocitopenia	280	Normal	1856	1a 10m	N
11	F	Normal	312	Normal	3325	8m	N
12	F	Normal	549	Linfopenia	1400	10m	N
13	F	Normal	304	Normal	2990	1a	N
14	F	Trombocitopenia	179	Normal	2415	7m	N
15	M	Normal	364	Normal	3410	3a	N
16	F	Trombocitopenia	230	Linfocitose	7803	7m	N
17	F	Normal	328	Normal	4324	1a 3m	N
18	M	Trombocitopenia	232	Normal	4250	6m	N
19	M	Normal	312	Normal	3240	1a 3m	N
20	F	Trombocitopenia	292	Normal	2040	1a 7m	N
21	M	Trombocitopenia	280	Normal	4165	1a 6m	N
22	M	Trombocitopenia	278	Normal	3255	9m	N
23	M	Normal	308	Normal	1820	1a	N
24	F	Trombocitopenia	224	Normal	3534	2a	N
25	F	Normal	412	Normal	2993	3a	N
26	F	Normal	400	Normal	1659	1a3m	N
27	F	Normal	336	Normal	4922	6m	N
28	F	Trombocitopenia	259	Normal	2385	3a	N
29	M	Normal	352	Normal	2720	1a	N
30	F	Trombocitopenia	184	Normal	1943	6m	N
31	F	Trombocitopenia	264	Normal	3045	8m	N
32	F	Normal	316	Linfocitose	7904	1a 4m	N
33	M	Trombocitopenia	176	Normal	2565	8m	N
34	F	Normal	312	Normal	3885	8m	P
35	F	Normal	457	Linfocitose	12075	10m	N
36	F	Normal	364	Normal	2964	6m	N
37	M	Normal	313	Normal	3534	2a	N
38	M	Trombocitopenia	120	Linfocitose	11088	2a	N
39	M	Normal	400	Normal	4752	10m	N
40	F	Trombocitopenia	184	Linfopenia	1260	3a	N
41	M	Normal	300	Linfopenia	1248	1a 1m	N

42	M	Trombocitopenia	117	Normal	3717	9m	N
43	F	Trombocitopenia	250	Normal	2070	9m	N
44	M	Trombocitopenia	219	Linfocitose	11160	2a	N
45	F	Trombocitopenia	276	Normal	2210	7m	N
46	F	Trombocitopenia	240	Normal	4223	8m	N
47	M	Trombocitopenia	288	Normal	4625	2a	N
48	M	Trombocitopenia	164	Normal	5655	1a 2m	N
49	M	Trombocitopenia	275	Normal	1920	11m	N
50	M	Normal	332	Normal	2112	11m	N