



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

**OCORRÊNCIA DO VÍRUS DA LEUCEMIA
FELINA NO DF E SUAS ALTERAÇÕES
LABORATORIAIS**

LARISSA CAMPOS AQUINO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM SAÚDE ANIMAL

**BRASÍLIA-DF
FEVEREIRO/2012**



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

**OCORRÊNCIA DO VÍRUS DA LEUCEMIA
FELINA NO DF E SUAS ALTERAÇÕES
LABORATORIAIS**

LARISSA CAMPOS AQUINO

ORIENTADORA: PROFa. DRa.GIANE REGINA PALUDO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM SAÚDE ANIMAL

PUBLICAÇÃO: 051/2012

**BRASÍLIA-DF
FEVEREIRO/2012**

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

AQUINO, L. C. **Ocorrência do vírus da leucemia felina no DF e suas alterações laboratoriais.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2012, 83p. Dissertação de Mestrado.

Documento formal autorizando reprodução desta dissertação de mestrado, empréstimo ou comercialização exclusivamente para fins acadêmicos, foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e acha-se arquivado na secretaria do programa. O autor reserva para si os outros direitos autorais de publicação. Nenhuma parte dessa dissertação pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor. Citações são estimuladas, desde que citada a fonte.

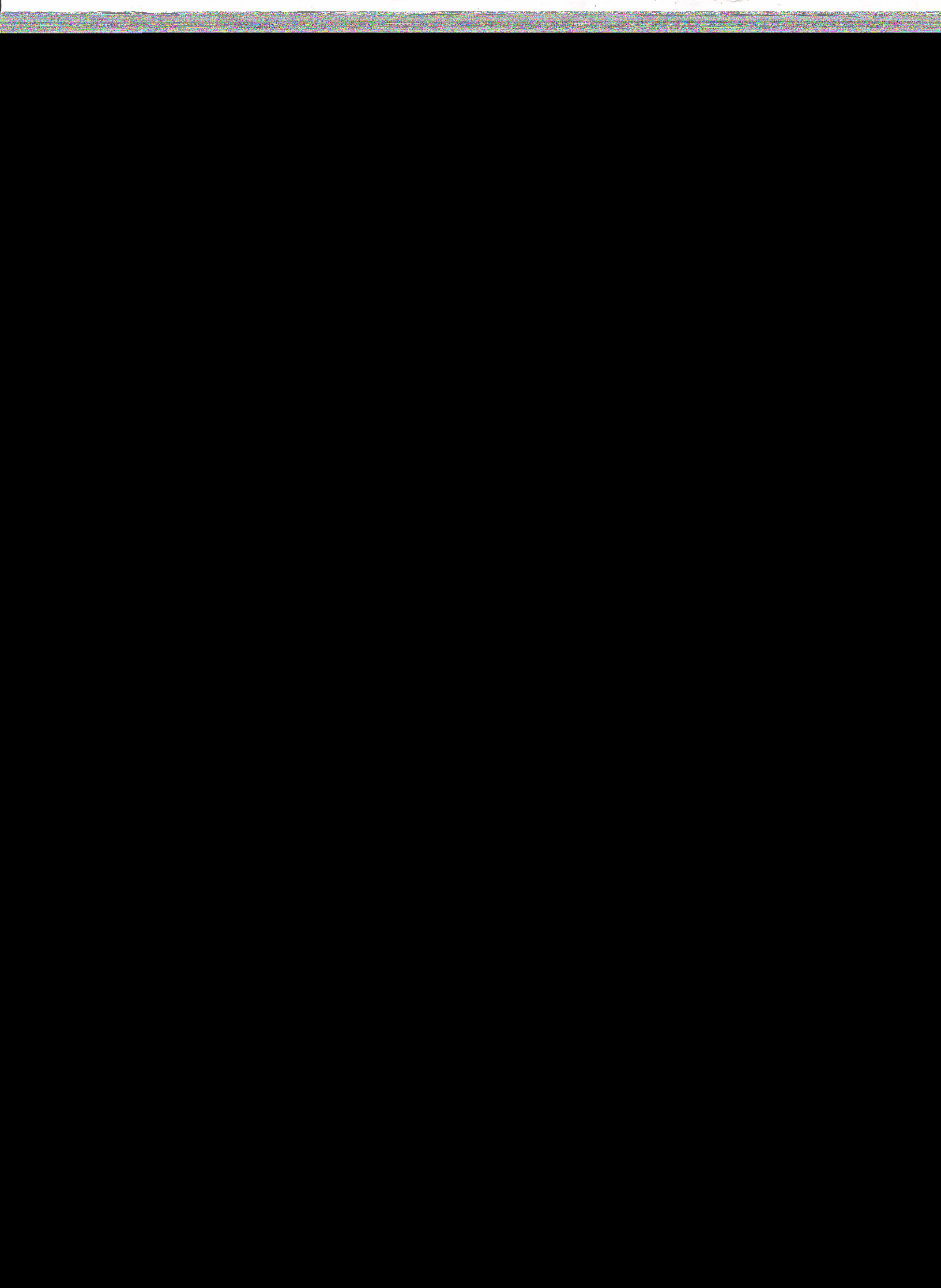
FICHA CATALOGRÁFICA

Aquino, Larissa Campos

Ocorrência do vírus da leucemia felina no DF e suas alterações laboratoriais / Larissa Campos Aquino orientação de Giane Regina Paludo - Brasília, 2012. 83p ...

Dissertação de Mestrado (M) - Universidade de Brasília / Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2012

1. Vírus da leucemia felina. 2. Felinos. 3. Hematologia. 4. Felinos.
5. Coinfeccção. 6. Distrito Federal I. AQUINO L. C. II. Título.



AGRADECIMENTOS

Sempre fui reconhecida por adjetivos que, no fundo, revelam uma mesma características: impaciente, apressada, precoce, ansiosa, acelerada... E como eu não podia deixar de negar estes atributos, venho há meses imaginando como eu faria meus agradecimentos. Queria fugir do trivial e ser diferente! Mas, depois de tanto tempo maquinando uma ideia inovadora, cheguei a mesma conclusão de todos: é impossível não começar a agradecer ao princípio de tudo, Àquele que possibilita qualquer coisa em nossa vidas: Deus. Como não ser grata às maravilhosas oportunidades que Ele me permitiu viver? A conclusão dessa dissertação é mais uma delas! E representa uma conquista sem precedentes, que correu perfeitamente graças à vontade Dele, que, seguramente, sabe o que é melhor pra todos nós.

Ele me deu o maior presente de todos: minha mãe, Lourdes. Digo presente porque ela não é só mãe! É pai, amiga, torcedora, guerreira e porto seguro. Eu não seria a mesma pessoa sem o exemplo dela. Dedico e ofereço a ela toda e qualquer conquista, por ser minha maior incentivadora e, principalmente, por acreditar na minha capacidade, até quando eu mesma não acredito. Muito obrigada mãe!

E, lógico, obrigada vó Diva, minha segunda mãe. Obrigada pelos cuidados e orações, elas têm funcionado!

Obrigada aos meus irmãos, Eduardo, Marlos e Rovena, por toda oportunidade de aprendizado, por serem exemplos tão diferentes e se preocuparem comigo (cada um a sua maneira...). À minha cunhada, Arlene, obrigada por toda ajuda oferecida não só a mim, mas a nossa família.

Felizmente não tenho família só em casa! Tive a oportunidade de escolher três irmãs: Paty, Bruninha e Dani. Muito obrigada pela amizade verdadeira! Obrigada por me ensinarem em todos os momentos de convívio e pelo apoio incondicional a qualquer hora!

Agradeço imensamente a minha orientadora, Giane, pela oportunidade oferecida e pela orientação ao longo de dois anos. Obrigada por ter acreditado no que eu podia oferecer e pela liberdade que tive ao longo dessa pesquisa, isso significou muito para mim.

Muito obrigada Tati, sem voce muita coisa não teria sido feita nessa pesquisa. Obrigada pela paciência e pelas inúmeras ajudas!

Obrigada à Ana Lourdes e ao Prof. Vítor pela valiosa ajuda estatística/epidemiológica!

Obrigada aos meus colegas de laboratório e de mestrado: Robertinha, Marcela, Anahí, Ana Cláudia, Milena, Fernando, Hudson, Débora e Ana Paula por tanta ajuda oferecida!

Obrigada BatCat, Cachorrinha, Hector, Jason, Layka, Matica, Phyybis, PPzinha, Willi e todos que passaram pelas nossas vidas!!! Essas criaturas representam minha vocação, admiração, respeito e amor.

Obrigada à CAPES, FINATEC e FAPDF pelo apoio financeiro.

Nesses momentos conclusivos, é comum lembrarmos de todos aqueles que contribuíram para que chegássemos até aqui. Amigos, colegas e colaboradores que infelizmente não fazem parte da nossa vida tanto quanto gostaríamos. Obrigada professores, colegas de curso, colegas do Hospital Veterinário da UnB e dos laboratórios anexos, estagiários, PIBICS e todos aqueles que passaram pela minha vida e gravaram um pouquinho deles em mim.

Por fim, sou muito grata ao que o mestrado me proporcionou: conhecimento, descobertas, oportunidades e novos horizontes! Espero que esse conteúdo possa retribuir de alguma forma àqueles que se interessam pelo maravilhoso mundo das retrovíroses felinas.

*" A compaixão para com os animais é das
mais nobres virtudes da natureza humana."*

Charles Darwin

*" Chegará o dia em que o homem conhecerá o
íntimo dos animais. Nesse dia um crime contra
um animal será considerado um crime contra a
própria humanidade."*

Leonardo da Vinci

SUMÁRIO

Resumo	X
Abstract	XI
Capítulo I	
Introdução	01
Referencial teórico	03
Objetivos	23
Referências	24
Capítulo II	
Introdução	30
Materiais e métodos	33
Resultados	43
Discussão	56
Conclusões	72
Referências	73
Capítulo III	
Considerações finais	82

RESUMO

O vírus da leucemia felina (FeLV) é um retrovírus que acomete gatos domésticos e já foi relatado mundialmente. Apenas o FeLV-A é transmitido, e, uma vez instalado no hospedeiro origina os subtipos B, C e T por meio de mutações ou recombinações com sequências endógenas. A infecção pelo FeLV está associada a doenças degenerativas e proliferativas de acordo com o subtipo. Um teste molecular (PCR) foi adaptado para diagnosticar gatos FeLV positivos em 3 grupos de animais do Distrito Federal: gatos mantidos em um abrigo (G1), gatos atendidos em clínicas e/ou hospitais veterinários (G2) e gatos de uma região periurbana com acesso à rua (G3). Eles foram avaliados quanto aos parâmetros hematológicos, subtipos do FeLV e principais coinfeções associadas. Realizou-se a comparação da PCR utilizada com o ELISA comercial. Foram identificados 38% de animais FeLV no G1, 26,8% no G2 e nenhum gato com o retrovírus no G3. Não houve associação da presença do FeLV com a idade, sexo ou acesso à rua. Observou-se que gatos FeLV positivos têm mais chance de ter anemia, mas não houve associação com FIV, hemoplasmas ou *T. gondii*. As proporções entre animais FeLV-A e FeLV-AB foram aproximadamente as mesmas e não demonstraram diferenças hematológicas significativas. A PCR utilizada apresentou 91,3% de concordância com o ELISA comercial. Concluiu-se que a ocorrência da infecção pelo FeLV no DF variou de acordo com o grupo amostrado, contudo as altas frequências de G1 (IC: 23,1-53%) e G2 (IC: 19,3-34,2%) não diferiram entre si. A coinfeção por FIV ou hemoplasmas não intensificou as alterações hematológicas nos gatos FeLV positivos. Além disso, os subtipos mais isolados (A e AB) parecem exercer efeitos semelhantes nas células precursoras hematopoiéticas.

Palavras-chave: gatos domésticos, vírus da leucemia felina, hematologia, subtipos.

ABSTRACT

Feline leukemia virus (FeLV) is a retrovirus that infects domestic cats and have been described worldwide. Subtype A is the only transmissible, and, once inside the host, it gives rise to 3 others subtypes: B, C and T by means of mutations or recombinations with endogenous sequences. Infection produced by FeLV is associated mainly with degenerative and proliferative diseases according to subtype. A molecular test (PCR) was tried to diagnose FeLV in 3 different groups of animals in the region of Distrito Federal, Brazil: cats from a shelter (G1), patients from veterinary clinics and/or hospitals (G2) and outdoor-roaming cats from a periurban region (G3). They were analyzed according to hematological parameters, subtypes and main co-infections. A comparison was made between PCR and ELISA test. FeLV provirus was detected in 38% of cats from G1, 26,8% in G2 and none cats from G3 was FeLV positive. Factors as age, sex and lifestyle were not significantly associated with risk of FeLV. Cats with FeLV were more prone to anemia, but there wasn't association with FIV, haemoplasmas or *T. gondii*. There wasn't significant difference between the number of cats with FeLV-A and FeLV-AB, nor was seen hematological differences between these two subtypes. The PCR agreed with ELISA in 91,3% of the results. We concluded that FeLV infection in the region of Distrito Federal fluctuate between the groups, although the high frequencies seen in G1 (IC: 23,1-53%) and G2 (IC: 19,3-34,2%) weren't statistically different. Besides that, co-infections by FIV or hemoplasmas didn't augmented hematological changes in cats with FeLV. Furthermore, the subtypes most commonly seen (A and AB) seem to cause the same effect in hematological precursor cells.

Key-words: domestic cats, feline leukemia virus, hematology, subtypes.

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

O vírus da leucemia felina (FeLV) é um retrovírus amplamente distribuído que acomete gatos domésticos. Como todo retrovírus, seu material genético é formado por ácido ribonucleico (RNA) que é convertido em desoxirribonucleico (DNA) por uma enzima e posteriormente é interpretado e codificado em proteínas necessárias para a formação de novos vírus. Nas células infectadas, o RNA viral transcrito em DNA é inserido no genoma da célula hospedeira (DNA proviral), dessa forma, conforme a célula se divide ela origina outras que também contém o DNA viral. No momento em que essas células iniciam a transcrição de suas proteínas, elas transcrevem o genoma viral. Os novos vírus formados saem das células por brotamento (Hartmann, 2006)

Por se tratar de um vírus envelopado, o FeLV é muito sensível ao ambiente externo, logo, a transmissão ocorre por contato direto via oronasal ou acesso à saliva e fezes de animais contaminados. a. A (Hartmann, 2006; Fenner, 2011).

O FeLV acomete principalmente gatos jovens e machos não castrados de vida livre e ocorre em 4 subtipos: FeLV-A, FeLV-B, FeLV-C e FeLV-T que,

em conjunto com a idade do gato no momento da infecção, determinam as principais síndromes induzidas em animais infectados. Os achados mais frequentes em gatos FeLV positivos são coinfeções por outros agentes patogênicos, anemia, linfoma, leucopenia e/ou trombocitopenia e leucemia e/ou doenças mieloproliferativas(Hartmann, 2006; Hartmann, 2011).

A prevalência do FeLV varia de acordo com a condição clínica dos animais. Cerca de 20% dos gatos sintomáticos tem FeLV, enquanto menos de 2% dos assintomáticos apresentam o vírus. A frequência do vírus também varia de acordo com a localidade e o grupo de animais avaliados. Acredita-se que a prevalência é maior entre gatos testados em clínicas veterinárias do que gatos de abrigos, em gatos com acesso à rua comparados aqueles que vivem estritamente em casa, e em gatos com alguma sintomatologia (Levy et al., 2008). No Brasil, estudos a respeito da ocorrência do FeLV demonstram frequências que oscilam de 6% em São Paulo (Junqueira-Jorge et al. 2005) a 47% em Belo Horizonte (Coelho et al. 2008). Contudo, a infecção pelo FeLV tem reduzido significativamente nos últimos 20 anos em alguns países.

A principal forma de controle da doença baseia-se na identificação e afastamento dos animais positivos do convívio com saudáveis, além da vacinação (Hartmann, 2006). Os principais testes empregados no diagnóstico do FeLV são o ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) e a imunofluorescência indireta (IFI). A PCR (polymerase chain reaction) foi adotada no diagnóstico clínico do FeLV recentemente e mostra-se útil não só para diagnosticar a doença, como também para determinar a condição de gatos com resultados discrepantes em outros testes, além de ser capaz de identificar animais com infecção latente (Arjona et al, 2007; Herring et al, 2001; Jackson et al, 1996; Pinches et al, 2007; Torres et al, 2008).

Considerando as sérias consequências da infecção pelo FeLV e a escassez de informações sobre a infecção por este vírus no Distrito Federal (DF), o presente trabalho propôs a utilização de uma ferramenta molecular (PCR) para o diagnóstico do FeLV, somado à investigação da ocorrência em diferentes grupos de animais e estudo das alterações laboratoriais, além da avaliação das principais coinfeções e subtipos associados.

REFERENCIAL TEÓRICO

Histórico

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. Por meio de microscopia eletrônica, Jarret descreveu que o agente infeccioso era aparentemente similar ao vírus da leucemia de murinos (MuLV), o que posteriormente confirmou-se como sendo um retrovirus. Desde então, o FeLV foi reconhecido como uma das viroses mais importantes na medicina de felinos e até hoje serve como modelo de estudo da história natural e patogênese molecular da subfamília gamaretrovírus. Além disso, exerce papel fundamental como modelo em pesquisas genéticas sobre câncer e retrovirose (Hartmann, 2006; Greggs et al., 2011).

Provável origem do FeLV

Com base em similaridades nas sequências de nucleotídeos, acredita-se que o FeLV evoluiu a partir do vírus da leucemia de murinos. É provável que, há quase 10 milhões de anos, no norte do deserto africano, um ancestral do gato adquiriu o MuLV por meio da ingestão ou mordida de um ancestral do roedor. Tal evento permitiu a incorporação do MuLV no genoma da linhagem germinativa do gato e, dessa forma, continua presente em todas as células de felinos domésticos como enFeLV (FeLV endógeno) e na natureza, disseminando entre os gatos, como FeLV exógeno. Estima-se que cerca de 10% do genoma animal contém sequências de retrovírus endógenos, o que representa vestígios da integração de DNA retroviral ao longo do curso da evolução (Hartmann, 2006; Greggs et al., 2011; Levy et al, 2008).

Taxonomia e classificação

O FeLV faz parte da família *Retroviridae*. As diferenças na morfologia, replicação, expressão e função das proteínas virais (Fenner, 2011) o incluem

na subfamília *Orthoretroviridae*, gênero *Gammaretrovirus* (Fenner, 2011; Neil, 2008). São agentes exógenos capazes de se replicar em diversos tecidos (linfócitos, medula óssea, glândulas salivares e epitélio respiratório). Trata-se de um vírus não citopático, cuja liberação das células infectadas é feita por meio de brotamento. Durante a replicação, o FeLV insere cópias do genoma viral no DNA das células precursoras hematopoiéticas e, dessa forma, o vírus persiste no organismo do felino (Hartmann, 2006).

Vírião e estrutura genômica

O vírião do FeLV possui 3 envoltórios: o envelope externo, derivado da membrana plasmática da célula hospedeira, abaixo, há uma matriz proteica que recobre a terceira camada, o capsídeo, dentro do qual se encontram o genoma e enzimas virais (Fenner, 2011; Neil, 2008).

O genoma viral é constituído por duas moléculas simples de RNA, sentido positivo e apresenta três genes principais, na seguinte ordem: 5'-*gag-pol-env*-3'. O *gag* (grupo associado ao antígeno) codifica as proteínas estruturais internas do capsídeo, nucleocapsídeo e matriz, o gene *pol* (polimerase) codifica a transcriptase reversa, e o gene *env* (envelope) codifica os peplômeros do envelope (superfície e transmembrana). As extremidades de cada molécula de RNA apresentam componentes distintos, cuja função não envolve a codificação proteica, mas sim a sinalização para a transcrição reversa, integração e transcrição viral após a integração. Esses componentes são formados por uma pequena sequência, R, que é repetida em ambos os lados da molécula de RNA, e de sequências únicas localizadas imediatamente ao lado de R: U3 na extremidade 3' e U5 na extremidade 5'. Após a transcrição viral, essas sequências únicas são duplicadas em ambas extremidades constituindo o LTR (*long terminal repeat*) (Murphy et al, 1999; Bolin et al., 2011a).

A superfície do envelope apresenta múltiplas projeções proteicas compostas de multímeros das proteínas codificadas pelo gene *env*: a glicoproteína de superfície gp70 (SU) e a proteína transmembrana p15e (TM). A principal proteína constituinte do capsídeo é a p27, que, assim como a proteína p15c da matriz, é codificada pelo gene *gag*. A p10 -

nucleocapsídeo (NC) - outro produto do *gag*, está associada com o vírion de RNA. A proteína codificada pelo gene *pol* é a transcriptase reversa, que de acordo com o sítio de ação, também age como protease (PR), integrase (IN) e RNase (Neil,2008; Bolin et al., 2011a).

Como é típico de todos os gamaretrovírus, a região amino-terminal da proteína SU apresenta um domínio de ligação ao receptor (RBD - *region of binding domain*) seguido de uma região rica em prolina (PRR - *proline rich region*) que realiza a modificação conformacional necessária para a entrada do vírus. O RBD possui duas regiões variáveis, VRA e VRB, que definem a especificidade ao receptor de acordo com o subtipo viral (Bolin et al., 2011a; Bolin et al., 2011b).

Replicação viral e a formação do provirus e do LTR

O processo de replicação viral começa com a ligação da glicoproteína do envelope (gp70) ao receptor na superfície celular. Após a entrada do capsídeo no citoplasma, inicia a ação da transcriptase reversa (TR), que gera a fita dupla de DNA viral. Esta é transportada para o núcleo e integrada no DNA cromossomal do hospedeiro pela integrase. Após essa integração, as cópias genômicas retrovirais são denominadas provirus, que são modelos para a transcrição dos novos vírus. A integração não ocorre em um local específico do genoma, mas em regiões com a cromatina aberta e que estão transcricionalmente ativas. O processo de replicação é acompanhado de alta frequência de mutação, que, aliada às recombinações com o enFeLV, originam a grande variabilidade genética do FeLV encontrado na natureza. A consequência dessa variação genética é uma população de vírus complexa continuamente modificada por seleção natural (Fenner, 2011; Neil, 2008; Murphy et al., 1999).

No processo de transcrição reversa, são adicionados cerca de 300-1300 pares de base em cada extremidade da molécula de DNA viral. Essas sequências terminais são denominadas *long terminal repeat* (LTR) e constituem-se de três elementos: U3, R e U5, além de pequenas sequências repetidas e invertidas nas extremidades. Os LTRs delimitam as extremidades do provirus inserido 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 dos retrovírus, além de apresentarem sequências promotoras e potencializadoras no U3, envolvidas na oncogênese relacionada ao vírus (Fenner, 2011; Neil, 2008; Murphy et al., 1999).

Sequências endógenas

O gato doméstico possui tanto retrovírus exógenos (FeLV, FIV) quanto endógenos (RD-114, enFeLV). Os vírus exógenos são transmitidos horizontalmente, enquanto as sequências endógenas estão normalmente presentes no genoma e são herdadas geneticamente (Hartmann, 2006; Berry et al., 1988). Sabe-se que há aproximadamente 12 a 15 cópias de sequências endógenas (enFeLV) semelhantes ao FeLV por genoma haploide (Sheets et al., 1992). Trata-se de sequências defeituosas e incapazes de codificar partículas virais, logo, não causam doença, porém, podem se combinar com o FeLV exógeno gerando novas cepas mais patogênicas (Sheets et al., 1992, Hartmann, 2006). De acordo com estudos de sequenciamento, além das deleções e mutações, a característica que mais difere o enFeLV do FeLV exógeno são os segmentos da porção U3 do LTR (Berry et al., 1988).

O enFeLV conserva elementos promotores e potencializadores nos LTRs, além de sequências propensas à tradução no gene *pol* e um gene *env* funcional. O sequenciamento do gene *env* de FeLVs recombinantes (FeLV-B, FeLV-C, FeLV-T) demonstra que as sequências mais próximas da extremidade 5' são semelhantes às do enFeLV, e aquelas próximas à 3' são encontradas apenas entre as cepas exógenas. As últimas seriam sequências necessárias para a viabilidade do vírus exógeno, portanto, são conservadas e não são substituídas por sequências endógenas. O local que se observa a maior quantidade de combinações entre sequências endógenas e exógenas é a região central do gene *env* (RBD), na porção SU, em posições determinadas (A, B, C, D, E, F e G). O local mais variável é a região D, onde se codifica um epítopo envolvido na neutralização viral do FeLV exógeno. Essa característica genética pode contribuir para a evasão do vírus da ação

do sistema imune, o que tem importância para latência viral e surgimento de tumores (Sheets, et al., 1992).

Subtipos

Atualmente o FeLV é classificado em 4 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, e na 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 sequências do enFeLV ou sofrer mutações, o que origina os subtipos recombinantes B e C, respectivamente (Hartmann, 2006; Stewart et al., 2011). A replicação dos subtipos B e C só é possível na presença do FeLV-A, pois muitas sequências importantes para replicação são substituídas nos recombinantes. Todos os isolados de animais naturalmente infectados possuem o FeLV-A, sozinho ou em 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, é altamente citolítico para linfócitos T e está associado à imunossupressão severa (Hartmann, 2006). Essa variante linfotrófica requer meios mais complexos para entrar 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 (FELIX) 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 dificilmente são transmitidas e, em alguns casos, são 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. 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 resultado de mutações em um domínio variável (VRA) no gene *env* do FeLV-A. Mutações menores no gene *env* parecem estar envolvidas no surgimento do FeLV imunossupressor, FeLV-T (Neil, 2008).

Epidemiologia

O FeLV é enzoótico na população de gatos domésticos e já foi documentado em felinos selvagens de diversas partes do mundo (Brown et al., 2008). Trata-se de um vírus de baixa prevalência (<2%) em gatos assintomáticos, mas pode chegar a 30% em animais doentes ou constantemente expostos ao vírus (Fenner, 2011; Hartmann, 2006). Desde o final da década de 80, tem-se observado que a frequência do FeLV está diminuindo em diversos países (Gleish et al., 2009a; Herring, 2001), devido ao maior acesso a testes diagnósticos, o que possibilita a remoção e/ou isolamento de animais infectados, além do advento da vacinação contra o FeLV - apesar de que o declínio nas taxas de infecção foi observado antes do surgimento da primeira vacina contra o FeLV, em 1985 (Hartmann, 2006).

A frequência do vírus varia consideravelmente de acordo com a região estudada. No Brasil há relatos de ausência do vírus em gatos no Rio de Janeiro (Figueiredo et al., 2009) e estudos em Minas Gerais que encontraram até 47% de gatos positivos (Coelho et al., 2011; Coelho et al., 2008). Concomitantemente, observa-se distribuição de 10-38% no Rio Grande do Sul (Meinerz et al., 2010; Silva et al., 2007) e em São Paulo 6,16% dos gatos

assintomáticos são FeLV positivos e, dentre os sintomáticos, 12% apresentam o vírus (Junqueira-Jorge et al., 2005). No exterior há 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 FeLV e 15,6% dos saudáveis foram positivos para o vírus (Arjona et al., 2000); nos EUA, 4,3% de gatos de rua apresentaram FeLV, enquanto no Canadá, a frequência encontrada foi de 3,4% (Little et al., 2009). Em Portugal (Duarte et al., 2010) e na Alemanha (Gleich et al., 2009a) foram observadas as menores frequências: 7,1% e 3,6%, respectivamente.

Os fatores de risco mais associados ao FeLV são o acesso à rua, idade jovem, sexo masculino, alta densidade populacional e condições de higiene ruins (Fenner, 2011; Levy et al., 2008). A prevalência do FeLV aumenta em gatos que têm acesso à rua, porque é necessário o contato direto para que haja transmissão. A transmissão é comum entre gatos que se socializam de alguma forma, ou seja, compartilham vasilhames, lambem-se e têm contato prolongado. A diferença na prevalência do FeLV entre machos e fêmeas é menor quando comparada àquela do FIV, sendo que os machos tem uma incidência ligeiramente superior à das fêmeas, provavelmente devido ao comportamento mais errante do macho (Hartmann, 2006).

Gatos infectados pelo FeLV disseminam o vírus principalmente pela saliva (Neil, 2008; Hartmann, 2006; Hoover et al., 1977), onde a concentração do vírus é maior (Hartmann, 2006), além de urina e fezes. Por se tratar de um vírus envelopado, rapidamente inativado quando exposto ao ar livre (Francis et al., 1979), é necessário que haja contato próximo para que ocorra a infecção. As principais vias são a oronasal (contato com a saliva por meio de lambeduras e/ou mordidas) (Hoover et al., 1977), ou menos comumente, pela via transplacentária (Fenner, 2001; Hartmann, 2006). Filhotes infectados *in utero* tornam-se persistentemente infectados e desenvolvem as doenças relacionadas com o vírus (Neil, 2008; Hartmann, 2006).

Observou-se que gatos separados por baias próximas não transmitem o vírus para animais próximos, diferente de quando são abrigados soltos no mesmo ambiente, logo, a transmissão por aerossol é pouco provável. O hábito de se lambar representa o mecanismo primário de transmissão, mas a

relativa estabilidade do FeLV em determinadas condições de temperatura e umidade sugere que a transmissão também pode ocorrer por meio do compartilhamento de alimentos, água ou vasilhames para defecar/urinar (Francis et al., 1979; Gomes-Keller et al., 2009). Rotas alternativas de transmissão, como por meio da picada de pulgas também devem ser consideradas, além da transmissão iatrogênica (Vobis et al., 2003, Hartmann, 2006).

Patogenia e características clínicas

As consequências da infecção pelo FeLV são variáveis. 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 pelo FeLV 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).

A incidência em gatos jovens é superior aos gatos adultos, porque há uma resistência relacionada com a idade: animais com até 12 semanas são altamente suscetíveis ao FeLV, enquanto aqueles acima de 16 semanas são difíceis de infectar natural e experimentalmente (Neil, 2008; Hartmann, 2006; Grant et al., 1980). 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. Embora a infecção pelo FeLV já tenha sido relatada em gatos de todas as idades, a incidência tende a diminuir em gatos mais velhos. Porém, essa resistência não é absoluta e depende da intensidade de exposição ao vírus. O risco de infecção aumenta, também em gatos adultos, quando os animais convivem por mais tempo com gatos virêmicos, como é observado em gatis ou casas onde o FeLV é endêmico e os animais se tornam positivos após um período prolongado de convívio com gatos infectados (Hartmann, 2006; Grant et al., 1980).

O subtipo A está sempre presente nas amostras isoladas, sendo que a metade também contém o subtipo B, enquanto o FeLV-C está presente em apenas 1-2% dos isolados. Embora o FeLV-B surja a partir do FeLV-A, ele também pode ser transmitido entre gatos quando há erros na formação do vírus e o genoma do FeLV-B é encapsulado em um envelope contendo glicoproteínas do A na superfície (Neil, 2008).

Após a infecção inicial, geralmente por via oronasal, o vírus se replica no tecido linfóide local, a partir daí os animais são classificados conforme sua capacidade imunológica de eliminar o vírus. Gatos imunocompetentes eliminam o vírus nessa fase inicial caracterizando a infecção abortiva e, portanto, são negativos em todos os testes diagnósticos. Contudo, alguns apresentam anticorpos contra o FeLV, logo, podem ser identificados em testes sorológicos. Estes animais, denominados gatos regressores, representam cerca de 60% dos casos (Hartmann, 2006; Greggs et al., 2011).

Caso não haja resposta imune local efetiva, o vírus se dissemina no interior de monócitos e linfócitos para vários tecidos alvo como 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 3 semanas aproximadamente, ocorre a viremia transitória, quando o animal consegue eliminar completamente o vírus (infecção regressiva). Porém, após a contaminação das células precursoras da medula óssea, o vírus replica-se em diversos órgãos, principalmente em tecidos linfóides e glândulas salivares, e é possível detectar antígenos virais livres no plasma e no interior de plaquetas e granulócitos (Hartmann, 2006). Apesar disso, 10% dos animais expostos conseguem interromper a viremia por meio de uma resposta imune incompleta (Linenberger et al., 1998; Greggs et al., 2011), pois o vírus permanece na medula, mas não se replica, ocorrendo a infecção latente. 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 por meio de cultivo celular do aspirado da medula óssea ou por testes moleculares, como a PCR. 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 intestino (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 virêmico e infeccioso para outros animais. 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 FeLV e à morte dentro de 3 anos (Hartmann, 2006). Cerca de 30-40% dos gatos expostos ao FeLV desenvolvem viremia persistente e com grande risco de desenvolver as síndromes relacionadas ao vírus (Linenberger et al., 1998, Greggs, et al., 2011).

Embora a latência seja uma sequela da infecção pelo FeLV, a maioria dos animais latentes consegue eliminar completamente os genes virais dentro de 9 a 16 semanas, e cerca de 10% dos gatos o faz após 30 meses de infecção latente. 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; Hartmann, 2006).

Animais FeLV positivos, com ou sem sintomatologia, geralmente não desenvolvem uma quantidade adequada de anticorpos contra o vírus, enquanto gatos FeLV negativos, que 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 viremia permanente apresentaram anticorpos neutralizantes contra o FeLV. Dessa forma, os diagnósticos do FeLV usualmente se baseiam em testes capazes de detectar o vírus ou alguma partícula viral (Hardy et al., 1976; Torres et al., 2005). Cerca de 50% dos gatos com acesso à rua tem evidências sorológicas de exposição ao FeLV, mas apenas 1-5%

desses gatos estão permanentemente infectados pelo vírus e a incidência de doenças é correspondentemente baixa (Neil, 2008).

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

As principais alterações causadas pelo FeLV são classificadas em neoplásicas (linfoma, leucemia, fibrossarcoma), disfunções hematológicas não neoplásicas (anemia, trombocitopenia) e imunossupressão. Mas, apesar do nome, o FeLV tende a causar principalmente anemia e imunossupressão. Um estudo norte americano com 8642 gatos FeLV positivos demonstrou que os achados mais frequentes nesses animais foram coinfeções diversas (15% - PIF, FIV, infecção respiratória superior, hemoplasmoses e estomatite), seguidas por anemia (11%), linfoma (6%), leucopenia e/ou trombocitopenia (5%) e leucemia e/ou doenças mieloproliferativas (4%). Os principais fatores envolvidos na variedade de doenças observadas são o subtipo viral e a idade do gato no momento da infecção (Hartmann, 2006; Hartmann, 2011).

Os principais determinantes de patogenicidade do FeLV são as sequências variáveis dentro do LTR e da porção SU do gene *env*, ao ponto de pequenas mudanças na sequência da SU modificarem dramaticamente o receptor usado e as doenças causadas. O LTR codifica o principal determinante do potencial oncogênico e da especificidade do FeLV. O SU governa a entrada do vírus nas células alvo por meio da interação com receptores específicos, e a variação neste seguimento origina os subtipos do FeLV. Cada subtipo utiliza um receptor celular diferente, apesar de todos serem proteínas transmembrana relacionadas ao transporte de substâncias. O FeLV-A utiliza um receptor de tiamina (feTHTR1), o FeLV-B entra nas células alvo por meio de um dos receptores de fosfato (FePit1 ou FePit2), o FeLV-C faz uso de um receptor de moléculas heme (FLVRC) e o FeLV-T se liga ao FePit1, porém, necessita de um co-fator para entrar na célula, a FELIX, uma proteína codificada pelo enFeLV principalmente em linfócitos. As principais alteração causadas pelo FeLV são resultado dessa interação entre

a gp70 do vírus e seu receptor (Neil, 2008; Bolin et al., 2011a; Bolin et al., 2011b).

Disfunções hematopoiéticas não neoplásicas

O FeLV infecta células hematopoiéticas, linfoides e células acessórias da medula óssea (Riegel, et al., 2000), logo, a anemia é reconhecida como a principal complicação não neoplásica que ocorre em gatos FeLV positivos. Síndromes de supressão medular associadas ao FeLV incluem: anemia (regenerativa e não regenerativa), neutropenias (permanentes, transitórias ou cíclicas), síndrome semelhante à panleucopenia e alterações plaquetárias (trombocitopenia e/ou anormalidades funcionais). A maioria dos mecanismos patogênicos necessários para o vírus ocasionar essas alterações depende da replicação viral, porém, a infecção latente também pode causar supressão medular, seja por interferência genética, por alteração na função da célula infectada ou expressão de antígenos de superfície causando destruição imunomediada da célula (Hartmann, 2006; Hartmann, 2011).

Os mecanismos envolvidos na anemia secundária ao FeLV são variados. A anemia hemolítica, que ocorre em cerca de 10% dos casos, é regenerativa e imunomediada, ou causada por hemoplasmas ou por hemorragias secundárias à trombocitopenia induzida pelo FeLV (Hartmann, 2006; Gleich et al., 2009). A anemia por citocinas inflamatórias corresponde a maioria dos casos e são arregenerativas. Sua causa é o efeito supressivo do vírus na medula óssea, resultado da infecção primária das células precursoras hematopoiéticas e das células estromais, responsáveis pelo suporte às células hematopoiéticas. Porém, o mecanismo exato pelo qual o FeLV causa essa supressão ainda não é totalmente compreendido. Normalmente essa anemia é normocítica ou macrocítica, sem indícios de reticulócitos. Acredita-se que a macrocitose induzida pelo FeLV seja resultado de um escape do processo de mitose durante a eritropoiese (Hartmann, 2006).

A aplasia eritroide pura, classificada como uma anemia severa (VG < 15%) sem regeneração, é causada pelo FeLV-C e ocorre em 1% dos gatos virêmicos. Não se trata de um processo neoplásico ou imunomediado, mas

sim por interação do vírus com o receptor que funciona como um exportador heme na superfície das células precursoras hematopoiéticas. Após essa interação, o receptor fica desregulado, a proteína heme se acumula dentro das células levando à morte celular (Neil, 2008; Gleich et al., 2009; Mathes et al., 1994). Consequentemente, não há diferenciação dos progenitores eritroides em unidades formadoras de colônias. A avaliação da medula óssea demonstra quase ausência de células eritroides, com precursores mieloides e megacariocíticos normais (Riegel et al., 2000).

A pancitopenia pode ocorrer na infecção pelo FeLV e acomete todas as linhagens celulares. A medula torna-se hipocelular e pode haver necrose. Alguns animais podem apresentar flutuações na hematopoiese com surgimentos periódicos de reticulócitos, granulócitos e plaquetas, que podem ser ocasionados por alteração nas células acessórias que promovem estrutura, moléculas coadesivas e citocinas reguladoras da hematopoiese. A avaliação da medula óssea demonstra pouca ou nenhuma célula precursora (Hartmann, 2006).

Além disso, animais FeLV positivos podem desenvolver anemia arregenerativa devido a doenças crônicas instaladas após o FeLV, seja infecciosa ou neoplásica, com alterações no uso do ferro e no tempo de vida dos eritrócitos (Gleich et al., 2009). Metástases na medula óssea de neoplasias linfoides com consequente mieloptise e mielofibrose, desordens mielodisplásicas, ou deficiências nutricionais podem estar envolvidas no desenvolvimento de anemias arregenerativas e/ou trombocitopenia em gatos FeLV positivos (Gleich et al., 2009).

Megacariócitos são alvos frequentes da infecção pelo FeLV, que pode causar diminuição na produção de plaquetas e/ou anormalidades no tamanho, forma, função e no seu tempo de vida. A infiltração medular leucêmica e anemia hemolítica imunomediada associadas ao FeLV causam alteração nas plaquetas e trombocitopenia e podem resultar em tendências a hemorragias (Hartmann, 2006).

A infecção pelo FeLV causa imunossupressão mais severa do que por FIV, portanto, há forte predisposição a infecções secundárias, principalmente ao coronavírus causador da peritonite infecciosa felina, hemoplasmas, coccidiose e doenças respiratórias superiores, que contribuem

significativamente para a morbidade e mortalidade dos gatos positivos (Hartmann, 2006). A perda ou diminuição da função imune em gatos FeLV se deve à perda progressiva de linfócitos T e B, além de neutrófilos. Especula-se que esses efeitos são causados por três mecanismos distintos: desordem mieloproliferativa mediada pelo FeLV, onde há super produção de leucócitos incompetentes maduros ou jovens que se sobrepõem às células hematopoiéticas. Dessa forma há redução na produção de células vermelhas e perda de funções do sistema imune. O segundo mecanismo seria por meio da proteína p15E, que pode ter propriedades imunossupressoras, impedindo a produção de substâncias de mitose em linfócitos T e/ou afetando a função de linfócitos sem modificar a função do receptor. Por fim, há a ação direta do vírus por ação citopática ou apoptose celular, embora acredita-se que este seja o mecanismo mais específico do FeLV-T (Greggs, et al., 2011). Essa variante causa atrofia do timo e depleção da zona paracortical dos linfonodos (Hartmann, 2011). Além disso, os neutrófilos de gatos FeLV positivos apresentam as funções quimiotática e fagocítica reduzidas. Nos linfócitos, a principal redução ocorre nas células CD8+ (helper e citotóxicas). Diversas funções imunes estão prejudicadas nos gatos infectados, tais como produção reduzida de imunoglobulinas, redução na função de neutrófilos e depleção do complemento. São animais que não respondem adequadamente à vacinação (Hartmann, 2011).

Contudo, algumas complicações relacionadas ao FeLV são secundárias à perda na regulação da resposta imune e formação de imunocomplexos, tais como anemia hemolítica, uveíte, glomerulonefrite e poliartrite (Hartmann, 2006; Hartmann, 2011).

Outras síndromes associadas ao FeLV incluem: enterite, síndrome da imunodeficiência adquirida, desordens reprodutivas, síndrome do enfraquecimento de filhotes, neuropatias e hepatopatias (Hartmann, 2006).

Disfunções hematopoiéticas neoplásicas

Doenças citoproliferativas associadas ao FeLV incluem leucemias, linfomas, fibrossarcoma e desordens mieloproliferativas. A maioria das doenças neoplásicas são atribuídas à mutagênese insercional, um processo

pelo qual o DNA do FeLV se integra no genoma do gato e interrompe ou desregula a expressão de proteínas envolvidas na regulação do ciclo, sobrevivência celular ou na apoptose (Greggs et al., 2011).

Especula-se que a infecção latente pelo FeLV possa causar o desenvolvimento de tumores, seja pela ação direta, liberação de citocinas ou estímulo imune crônico. Os linfomas relacionados com o FeLV dependem do tipo e localização do tumor. Em geral, linfomas de gatos FeLV positivos são predominantemente de células T e localizam-se no mediastino, cavidade nasal, fígado, rins e região retrobulbar (Hartmann, 2006).

Todas as linhagens celulares hematopoiéticas são suscetíveis a transformação pelo FeLV, o que resulta em doenças mieloproliferativas ou síndrome mielodisplásica. Tanto a leucemia linfóide quanto a mieloide (granulocítica, eritróide ou megacariocítica) podem acontecer. A síndrome mielodisplásica, caracterizada por citopenias no sangue periférico e alterações displásicas na medula óssea, é considerada um pré-estágio da leucemia mieloide aguda (Hartmann, 2011, Hartmann, 2006). As leucemias crônicas raramente são relacionadas ao FeLV (Hartmann, 2006).

A proliferação anormal de fibroblastos (mielofibrose) resulta do estímulo medular crônico, tais como regeneração hiperplásica ou neoplásica causada pelo FeLV (Hartmann, 2006).

Os fibrossarcomas associados com o FeLV são causados pelo FeSV (feline sarcoma virus), um vírus recombinante resultado da associação do FeLV-A com um oncogene celular (*fes*, *fms*, *fgr*). O FeSV rapidamente causa tumores multifocais após um curto período de incubação, geralmente em gatos jovens. São recombinantes defectivos, cuja replicação depende da presença do FeLV-A (Hartmann, 2006).

A relação entre oncogênese e subtipo do FeLV é complexa. FeLV-B é mais comum em gatos com tumores do que em gatos assintomáticos. A forma clínica mais comum do FeLV-B é o linfossarcoma do timo, mas anemia não regenerativa e outros tumores linfóides e leucemia mieloide também podem acontecer (Neil, 2008).

Coinfecções

Apesar da simplicidade da sua constituição genética, o FeLV é capaz de causar diretamente consideráveis distúrbios orgânicos. Contudo, há casos em que o animal infectado sucumbe aos efeitos de agentes secundários, cuja instalação e propagação foram indiretamente facilitadas pelo FeLV. Portanto, a sintomatologia do FeLV é vasta, uma vez que depende não só dos seus efeitos diretos, como também do tipo de agente oportunista presente. As coinfecções mais associadas ao FeLV são o vírus da imunodeficiência felina (Gleich et al., 2009; Marçola, 2011), hemoplasmas (Murphy et al., 1999; Luria et al., 2004), coccidiose, herpesvírus felino e calicivírus felino (Hartmann, 2006). Essas coinfecções são comumente justificadas pela imunossupressão e fatores de risco em comum com o FeLV e contribuem significativamente para a progressão, morbidade e mortalidade dos gatos positivos (Hartmann, 2006)

Segundo Neil, (2008), a toxoplasmose é mais comum em gatos infectados com FeLV. O *T. gondii* é um protozoário intracelular obrigatório capaz de infectar ampla variedade de hospedeiros, incluindo mamíferos e aves. Felinos são os únicos hospedeiros definitivos conhecidos e transitoriamente eliminam oocistos no ambiente. O homem entra no ciclo como um hospedeiro intermediário e mulheres grávidas estão em especial risco, pois, caso a primo infecção ocorra durante a gravidez, pode haver transmissão transplacentária, o que está associado a alterações neurológicas e/ou oftálmicas no feto (Luria et al., 2004; Lyons et al., 2002). É neste ponto que o gato doméstico assume grande importância na saúde pública, ou seja, no risco de eliminar oocistos pelas fezes e conseqüentemente infectar o homem, especialmente imunossuprimidos. Contudo, o período de eliminação dos oocistos é curto, e a maioria dos gatos soro reativos já passaram desta fase, já que a maioria entra em contato com o *T. gondii* durante os 6 primeiros meses de vida. Em raras ocasiões pode haver reeliminação de oocistos pelos gatos portadores, mas esse evento é pouco freqüente (Lyons et al., 2002).

Dado que os gatos não eliminam os organismos de seus tecidos, a presença de IgM ou IgG está relacionada com a infecção e é a ferramenta

mais utilizada no diagnóstico da toxoplasmose (Luria et al., 2004). Apesar de Murphy et al. (1999) afirmar que gatos com FeLV têm mais toxoplasmose, outros autores (Akhtardanesh et al., 2010; Luria et al., 2004) não encontraram essa associação.

O vírus da imunodeficiência felina (FIV) é um *Lentivírus*, da família *Retroviridae*. Foi isolado pela primeira vez em 1987 de um grupo de gatos com alta prevalência de doenças oportunistas e degenerativas. Desde então, o FIV tem sido associado com diversas síndromes e já foi identificado mundialmente em gatos como um agente endêmico. O diagnóstico do FIV é feito por meio do ELISA, Western blot - que identificam anticorpos; isolamento viral ou PCR, que detecta o DNA proviral inserido no genoma do hospedeiro (Murphy et al., 1999; Ravi et al., 2010).

A principal alteração causada pelo FIV é o prejuízo à função imune devido à depleção de linfócitos T CD4+, o que aumenta a suscetibilidade a infecções oportunistas e degenerativas, assim como ocorre na infecção por HIV em humanos (Ravi et al., 2010).

O curso da doença é caracterizado pela forte replicação viral inicial, seguido pelo declínio nos linfócitos T CD4+, supressão viral e um longo período assintomático. Após essa última fase, ocorre reativação viral acompanhada pelas principais síndromes relacionadas ao vírus, nesse ponto a maioria dos animais são adultos ou idosos (Murphy et al., 1999; Hartmann, 2006; Hartmann, 2011).

A infecção por FIV em gatos previamente infectados pelo FeLV causa doença mais severa do que por cada retrovírose individualmente. Acredita-se que essa potencialização seja causada por interação de ambas retrovíroses na imunidade do hospedeiro. É possível que a imunossupressão induzida pelo FeLV impeça o hospedeiro a responder adequadamente à infecção pelo FIV. Também é possível que a pré-existência do FeLV altere os níveis de células suscetíveis ao FIV ou aumente a presença de receptores de superfície, fazendo com que o FIV se instale e se dissemine mais facilmente (Pedersen et al., 1990; Neil, 2008).

Micoplasmas hemotróficos ('hemoplasmas') são bactérias que infectam e ligam-se à superfície de eritrócitos. A classificação recente na família *Mycoplasmaeae*, baseada em sequenciamento molecular e dados

filogenéticos, é justificada pelas características fenotípicas dos micoplasmas hemotróficos, como seu tamanho pequeno, rigorosos requerimentos para crescimento em cultura e ausência de parede celular. Essa nova classificação renomeou as espécies *Haemobartonella*, como a *Hemobartonella felis* que foi reclassificada como *Mycoplasma haemofelis*. Análises moleculares levaram à descoberta de duas novas espécies felinas: 'Candidatus Mycoplasma haemominutum' e 'Candidatus Mycoplasma turicensis'. Há indícios de que os gatos também podem ser infectados por uma quarta espécie, semelhante à do cão, o 'Candidatus Mycoplasma haematoparvum'. As espécies identificadas como 'Candidatus' ainda apresentam classificação provisória, uma vez que a caracterização fenotípica delas é dificultada *in vitro*. O *M. haemofelis* não é incluído nesses casos, pois trata-se de uma espécie já existente que apenas foi reclassificada (Tasker, 2010).

Dentre as espécies de hemoplasmas felinos, o *M. haemofelis* é considerado o mais patogênico e envolvido com a doenças clínicas, apesar dos resultados discordantes entre estudos experimentais e aqueles em animais naturalmente infectados, nos quais observa-se anemia hemolítica nos primeiros e ausência de associação entre anemia e infecção no segundo. Porém, essas diferenças podem apenas refletir diferenças na população ou na cepa estudadas, ou demonstram as diferenças clínicas entre o curso agudo e o crônico da infecção (Tasker, 2010).

A via natural de transmissão dos hemoplasmas ainda não foi confirmada, apesar de a transmissão por pulgas ser a mais aceita, acredita-se que possam existir outros meio de transmissão. A anemia induzida pelos hemoplasmas é em grande parte por hemólise extravascular – baço, fígado, pulmões, medula óssea -, contudo, a hemólise intravascular também pode ocorrer, conforme os eritrócitos infectados tornam-se mais frágeis, seja por ação direta do parasita, seja por via imunomediada. Quando associado a retrovirus, como o FeLV, os hemoplasmas induzem anemia arregenerativa, acompanhada de hiperproteinemia, aumento das enzimas hepáticas e, ocasionalmente, hiperbilirrubinemia. Tradicionalmente o diagnóstico das hemoplasmoses era baseado na citologia, mas sua sensibilidade e especificidade são baixas. O advento da PCR proporcionou maior confiança

no diagnóstico das hemoplasmoses, devido ao seus elevados percentuais de sensibilidade e especificidade, e a possibilidade de distinguir as espécies envolvidas (Skyles, 2010).

Segundo Skyles (2010), gatos coinfectados com FeLV e '*Candidatus M haemominutum*' desenvolvem anemia mais pronunciada do que gatos com *M haemofelis* apenas. Geralmente os hemoparasitas induzem uma anemia regenerativa, mas pode se tornar não regenerativa quando em associação com o FeLV. Coinfecção com hemoplasmas deve ser considerada em qualquer gato FeLV com macrocitose, mesmo sem reticulocitose.

Animais coinfectados com FeLV e *M haemofelis* são mais prováveis de desenvolver doenças mieloproliferativas do que gatos infectados apenas por FeLV. Os mecanismos propostos incluem imunossupressão induzida pela infecção pelo hemoplasma, hiperplasia eritroide e estímulo imune que levaria ao aumento da taxa de mutação e resultando em doenças mieloproliferativas (Skyles, 2010; Tasker, 2010).

Estudos demonstraram associação entre retrovirus e hemoplasmoses. Gatos infectados com *M haemofelis* nos EUA foram 6 vezes mais prováveis de estarem infectados com FIV do que gatos negativos para hemoplasmas. No Brasil, a infecção por retrovírus foi associada primariamente com infecção por '*Candidatus M haemominutum*', sendo que a associação foi mais forte para o FIV. Na Alemanha detectou-se uma associação do FeLV com hemoplasmas (Skyles, 2010).

Diagnóstico

Kits ELISA comerciais são usados rotineiramente para detectar a proteína p27 do capsídeo do FeLV, esse antígeno normalmente é encontrado no sangue de gatos infectados dentro de um mês após a exposição. Em filhotes o período de surgimento da viremia é variável e, portanto nesses casos pode ser necessário repetir o teste. Casos de baixo risco, assintomáticos ou discordantes, recomenda-se a PCR para aumentar a sensibilidade de detecção ou confirmar um teste de antígeno positivo. Menos comumente realiza-se teste de imunofluorescência para confirmar a presença de antígenos do FeLV, mas esse teste tem propensão a falsos resultados e é

pouco acessível para rotina diagnóstica. A cultura do vírus é realizada apenas em laboratórios de referência, mas não é aplicado na prática clínica (Hartmann, 2006; Levy et al., 2008).

A importância de um teste acurado reside no fato de que a forma mais efetiva de prevenir a disseminação da infecção é a identificação e isolamento dos gatos infectados. Os testes mais utilizados atualmente na rotina clínica são imunofluorescência indireta e o ELISA. Ambos detectam a proteína p27, abundantemente produzida na maioria dos gatos infectados. No entanto, o ELISA detecta a p27 livre no plasma/soro, enquanto a IFI detecta esse antígeno no interior de plaquetas e neutrófilos (Murphy et al., 1999).

O ELISA é indicado como teste de rotina e um resultado positivo indica que o gato está virêmico. Esse teste é positivo na primeira fase de viremia, nas primeiras semanas de infecção, antes da medula óssea ser atingida, portanto, um resultado positivo pode indicar infecção transitória ou persistente. A maioria dos animais tornam-se positivos no ELISA cerca de 28 dias após a exposição (Hartmann, 2006) e aproximadamente 10% dos animais testados são falsos negativos, especialmente em casos de infecção latente (antígeno negativo e provirus positivo (Levy et al., 2008).

A IFI torna-se positiva após a infecção da medula óssea, portanto, animais positivos na IFI, geralmente são persistentemente virêmicos, porém não detecta animais no início da infecção. Dessa forma, a IFI é indicada como teste confirmatório ou como indicador do prognóstico. Trata-se de um teste feito apenas em laboratórios de referência, uma vez que seu processamento requer técnicos qualificados (Hartmann, 2006).

A PCR tem sido adaptada para o diagnóstico de rotina do FeLV. Diferente do ELISA e da IFI, a PCR não detecta antígenos virais, mas sequências genéticas do FeLV inseridas nas células infectadas e, portanto, é mais sensível e específica. Sua principal desvantagem é a necessidade de ser realizado em laboratórios bem equipados e por uma equipe treinada, a fim de evitar deterioração de material e/ou resultados falsos positivos ou negativos por erros de manipulação. No entanto, trata-se de um teste que, quando realizado de forma adequada, permite a detecção do FeLV em culturas, sangue e tecidos, tanto frescos quanto fixados, em até uma semana após a exposição ao vírus (Levy et al., 2008). Em casos de infecção latente,

quando o vírus não se replica, os testes convencionais, que se baseiam na detecção do antígeno, são negativos. Nesse caso, a PCR consegue detectar gatos FeLV positivos. Além disso, em muitos animais, os antígenos virais não são detectados devido à ação do sistema imune, mas o vírus está inserido no genoma celular e pode ser identificado pela PCR (Hartmann, 2006).

OBJETIVOS

Este estudo teve como objetivos principais:

- Estimar a ocorrência natural do FeLV em 3 grupos de gatos domésticos de diferentes localidades do DF;
- Identificar os subtipos presentes nas infecções por FeLV;
- Correlacionar a presença do FeLV com as infecções por hemoplasmas, FIV e *Toxoplasma gondii*;
- Correlacionar a presença do FeLV, subtipos e coinfeções com parâmetros hematológicos;
- Avaliar a concordância entre a PCR e o teste comercial ELISA;

REFERÊNCIAS

- AKHTARDANESH, B., ZIAALI, N., SHARIFI, H., REZAEI, S. Feline immunodeficiency virus, feline leukemia virus and *Toxoplasma gondii* in stray and household cats in Kerman-Iran: Seroprevalence and correlation with clinical and laboratory findings. **Research in Veterinary Science**, v. 89, p. 306-310, 2010.
- ARJONA, A., ESCOLAR, E., SOTO, I., BARQUERO, N., MARTIN, D., GOMES-LUCIA, E. Seroepidemiological survey of infection by feline leukemia virus and immunodeficiency virus in Madrid and correlation with some clinical aspects. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 3448-3449, 2000.
- BERRY, B. T., GHOSH, A. K., KUMAR, D. V., SPODICK, D. A., ROY-BURMAN, P. Structure and function of endogenous feline leukemia virus long terminal repeats and adjoining regions. **Journal of Virology**, v. 62, p. 3631-3641, 1988.
- BLANCO, K., PRENDAS, J., CORTES, R., JIMENEZ, C., DOLZ, G. Seroprevalence of viral infectious in domestic cats in Costa Rica. **Journal of Veterinary Medicine Science**, v. 71, p. 661-663, 2009.
- BOLIN, L. L., AHMAD, S., LEVY, L. S. The surface glycoprotein of a natural feline leukemia virus subgroup A variant, FeLV-945, as a determinant of disease outcome. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 143, p. 221-226, 2011a.
- BOLIN, L. L., LEVY, L. S. Viral determinants of FeLV infections and pathogenesis: lessons learned from analysis of a natural cohort. **Viruses**, v. 3, p. 1681-1681, 2011b.
- BROWN, M. A., CUNNINGHAM, M. W., ROCA, A. L., TRYLER, J. L., JOHNSON, W. E., O'BRIEN, S. J. Feline leukemia virus from Florida panthers. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, p. 252-259, 2008.
- 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. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, p. 778-783, 2011

- COELHO, F. M., BOMFIM, M. R. Q., CAXITO, F. A., RIBEIRO, N. A., LUPPI, M. M., COSTA, E. A., OLIVEIRA, M. E., FONSECA, F. G., RESENDE, M. Naturally occurring feline leukemia virus subgroup A and B infections in urban domestic cats. **Journal of General Virology**, v. 89, p. 2799-2805.
- 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.
- Fenner's Veterinary Virology**. 4. ed. London: Academic Press, 2011. 491p.
- FIGUEIREDO, F. B., BONNA, I. C. F., NASCIMENTO, L. D., COSTA, T., BAPTISTA, C., PACHECO, T. M. V., AMENDOEIRA, M. R. R., MADEIRA, M. F. Serological evaluation for detection of anti-Leishmania antibodies in dogs and cats in the district of Santa Rita de Cássia, municipality of Barra Mansa, state of Rio de Janeiro. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.42, p. 141-145, 2009.
- FLYNN, J. N., DUNHAM, S. P., WATSON, V., JARRET, O. Longitudinal analysis of feline leukemia virus-specific cytotoxic T lymphocytes: correlation with recovery from infection. **Journal of Virology**, v. 76, p. 2306-2315, 2002.
- FRANCIS, D. P., ESSEX, M., GAYZAGIAN, D. Feline leukemia virus: survival under home and laboratory conditions. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 9, p. 154-156, 1979.
- GLEICH, S. E., KRIEGER, S., HARTMANN, K. Prevalence of feline immunodeficiency virus and feline leukaemia virus among client-owned cats and risk factors for infection in Germany. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 11, p. 985-992, 2009a.
- GLEICH, S. E., HARTMANN, K. Hematology and serum biochemistry of feline immunodeficiency virus-infected and feline leukemia virus-infected cats. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v23, p. 552-558, 2009b.

- GOMES-KELLER, M. A., GONCZI, E., GRENACHER, B., TANDON, R., HOFMANN-LEHMANN, R., LUTZ, H. Fecal shedding of infectious feline leukemia virus and its nucleic acid: a transmission potential. **Veterinary Microbiology**, v. 134, p. 208-217, 2009.
- GRANT, C. K., ESSEX, M., GARDNER, M. B., HARDY, W.D. Natural feline leukemia virus infection and the immune response of cats of different ages. **Cancer Research**, v.40, p. 823-829, 1980.
- GREGGS, W. M., CLOUSER, C. L., PATTERSON, S. E., MANSKY, L. M. Broadening the use of antiretroviral therapy: the case of feline leukemia virus. **Therapeutics and Clinical Risk Management**, v.7, p. 115-122, 2011.
- HARDY, W. D., HESS, P. W., MACEWEN, E. G., McCLELLAND, A. J., ZUCKERMAN, E. E., ESSEX, M., COTTER, S. M., JARRET, O. Biology of feline leukemia virus in the natural environment. **Cancer Research**, v. 36, p. 582-588, 1976.
- HARTMANN, K. Feline leukemia virus infection. In: GREENE, C. E. **Infectious Diseases of the Dog and Cat**, ed 3, St Louis, 2006, Saunders Elsevier, p 107.
- HARTMANN, K. Clinical aspects of feline immunodeficiency and feline leukemia virus infection. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.143, p. 190-201, 2011.
- HERRING, E. S., TROY, G. C., TOTH, T. E., FORRESTER, S. D., WEIGT, L. A., HERRING, I. P. Detection of feline leukaemia virus in blood and bone marrow of cats with varying suspicion of latent infection. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 3, p. 133-141, 2001.
- HOOVER, E. A., OLSEN, R. G., MATHES, L. E., SCHALLER, J. P. Relationship between feline leukemia virus antigen expression and viral infectivity in blood, bone marrow, and saliva of cats. **Cancer Research**, v. 37, p. 3707-3710, 1977.
- JAIN, N. C. **Essentials of Veterinary Hematology**. Lea & Febiger: Philadelphia, 1993.
- JUNQUEIRA-JORGE, J. *Estudo dos fatores de risco da leucemia viral felina no município de São Paulo*. 2005. 43 f. Dissertação mestrado. São

Paulo: Universidade de São Paulo/Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.

- LEVY, J., CRAWFORD, C., HARTMANN, K., HOFMANN-LEHMANN, R., LITTLE, S., SUNDAHL, E., THAYER, V. 2008 American Association of Feline Practitioners' feline retrovirus management guidelines. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 10, p. 300-316, 2008.
- LYONS, R. E., MCLEOD, R., ROBERTS, C. W. Toxoplasma gondii tachyzoite-bradyzoite interconversion. **Trends in Parasitology**, v. 18, p. 198-201, 2002.
- LINENBERGER, M. L., ABKOWITZ, J. L. **Haematological disorders associated with feline retrovirus infections**. In: Baillieres Clinical Haematology. 1998; 8: 73-112.
- LURIA, B. J., LEVY, J. K., LAPPIN, M. R., BREITSCHERDT, E. B., LEGENDRE, A. M., HERNANDEZ, J. A., GORMAN, S. P., LEE, I. T. Prevalence of infectious diseases in feral cats in northern Florida. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 6, p. 287-296, 2004.
- MARÇOLA, T. G. *Estudo da avaliação laboratorial e ocorrência da infecção pelo vírus da imunodeficiência felina e coinfeções em felinos domésticos de diferentes localidades do Distrito Federal*. 2011. 67 f. Dissertação de Mestrado (M) - Universidade de Brasília/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária.
- MATHES, L. E., PANDEY, R., CHAKRABARTI, R., HOFMAN, F. M., HAYES, K. A., STROMBERG, P., ROY-BURMAN, P. Pathogenicity of a subgroup C feline leukemia virus (FeLV) is augmented when administered in association with certain FeLV recombinants. **Virology**, v. 198, p. 185-195, 1994.
- MEINERZ, A. R. M., ANTUNES, T. A., SOUZA, L. L., NASCENTE, P. S., FARIA, R. O., CLEFF, M. B., GOMES, F. R., NOBRE, M. O., REISCHAK, D., SCHUCH, L. F. D., MEIRELES, M. C. A. Frequência do vírus da leucemia felina (VLFe) em felinos domésticos (*Felis catus*) semidomiciliados nos municípios de Pelotas e Rio Grande. **Ciência Animal Brasileira**, v. 11, p. 90-93, 2010.
- MURPHY, F.A., PAUL, E., GIBBS, J., HORZINEK, M. C., STUDDERT, M. J. **Veterinary Virology**. 3º ed. California: Elsevier, 1999.641p.

- NEIL, J. C. Feline leukemia and sarcoma viruses. In: **Encyclopedia of Virology**. 3^o ed. pg. 185-190. Oxford: Elsevier, 2008.
- PEDERSEN, N. C., TORTEN, M., RIDEOUT, B., SPARGER, E., TONACHINI, T., LUCIW, P. A., ACKLEY, C., LEVY, N., YAMAMOTO, J. Feline leukemia virus infection as a potentiating cofactor for the primary and secondary stages of experimentally induced feline immunodeficiency virus infection. **Journal of Virology**, v. 64, p. 598-606, 1990.
- RAVI, M., WOBESER, G. A., TAYLOR, S. M., JACKSON, M. L. 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.
- RIEGEL, C. M., STOCKHAM, S. Anemia associated with bacterial and viral infections. In: **Schalm's Veterinary Hematology**. 5^o edição. Cap. 32, pg. 216-225, 2000.
- SILVA, F. R. C. *Prevalência das infecções pelo vírus da leucemia viral felina e da imunodeficiência viral felina na cidade de Porto Alegre*. 2007. 57 f. Dissertação de mestrado. Rio Grande do Sul: Universidade Federal do Rio Grande do Sul/ Faculdade de Veterinária.
- SHEETS, L. S., PANDEY, R., KLEMENT, V., GRANT, C. K., ROY-BURMAN, P. Biologically selected recombinants between feline leukemia virus (FeLV) subgroup A and endogenous FeLV elements. **Virology**, v.190, p. 849-855, 1992.
- SKYES, J. E. Feline hemotropic mycoplasmas. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 40, p. 1157-1170, 2010.
- TASKER, S. Haemotropic mycoplasmas. What's their real significance in cats? **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 12, p. 369-381, 2010.
- TIQUE, V., SÁNCHEZ, A., ÁLVAREZ, L., RÍOS, R., MATTAR, S. Seroprevalence del virus de leucemia e imunodeficiencia felina en gatos de Montería, Córdoba. **Revista Medicina Veterinária e Zootecnia**, 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, p. 272-283, 2005.

VOBIS, M., D'HAESE, J., MEHLHORN, H., MENCKE, N. Evidence of horizontal transmission of feline leukemia virus by cat flea (*Ctenocephalides felis*). **Parasitology Research**, v. 91, p. 467-470, 2003.

CAPÍTULO II

OCORRÊNCIA DO VÍRUS DA LEUCEMIA FELINA NO DF E SUAS ALTERAÇÕES LABORATORIAIS

INTRODUÇÃO

O vírus da leucemia felina é um patógeno de grande importância na medicina veterinária, cujo comportamento biológico é influenciado por fatores relacionados ao hospedeiro (condição de saúde, densidade populacional, estilo de vida, gênero, idade, procedência, condição reprodutiva, vacinação, momento da infecção), ao vírus (cepa, virulência, patogenicidade, mutações e combinações), à região geográfica e ao método diagnóstico utilizado (ELISA, PCR, IFI) (Murphy et al., 1999; Levy et al., 2008; Grant et al., 1980). Em vista disso, as frequências a respeito da infecção pelo FeLV já descritas variam consideravelmente (Teixeira et al., 2007; Blanco et al., 2009; Figueiredo et al., 2009; Meinerz et al., 2010; Macieira et al., 2008; Junqueira-Jorge, 2005; Coelho et al., 2011; Silva, 2007; Tique et al., 2009; Lee et al.,

2002; Arjona et al., 2000; Little et al., 2009; Souza et al., 2002; Gleich et al., 2009; Duarte et al., 2010).

Estudos a respeito da dinâmica populacional do FeLV demonstram que esta depende do tamanho da população e da relação entre a densidade e o padrão de contato entre os indivíduos. Acredita-se que o FeLV pode se extinguir em populações pequenas e permanecer endêmico em populações densas (Gleich et al., 2009). Contudo, nos últimos 20 anos tem-se observado uma redução na prevalência do FeLV em alguns países (Gleich et al., 2009; Herring et al., 2001). No Brasil não é possível inferir a mesma tendência, pois não há estudos epidemiológicos nacionais e/ou regionais, atuais ou antigos, baseados em amostragens populacionais probabilísticas passíveis de fornecer inferências estatísticas para toda população de gatos. Em grande parte, isso se deve às características da população de felinos, à falta de dados a respeito da quantidade aproximada de animais e à dificuldade na coleta de amostras.

Considerando essas circunstâncias, neste estudo procurou-se organizar a ocorrência do vírus de acordo com os cenários mais comuns na realidade da região avaliada (gatos mantidos em um abrigo, gatos atendidos em clínicas e/ou hospitais veterinários e gatos domiciliados com acesso à rua de uma região periurbana).

Além das alterações neoplásicas, a infecção pelo FeLV é associada a uma grande variedade de disfunções hematológicas (anemia, neutropenia, panleucopenia e trombocitopenia) (Linenberger et al., 1998; Stutzer et al., 2010; Riegel et al., 2000), sendo que uma das mais discutidas é sua capacidade de causar imunossupressão. As modificações induzidas tanto na quantidade, quanto na função dos leucócitos são reconhecidas (Hartmann, 2006; Hartmann, 2011; Linenberger et al., 1998), mas pouco se sabe a respeito de como essa modificação no sistema imune propicia a instalação de outros patógenos. Logo, especulou-se se a infecção por FeLV facilitaria a infecção por outros patógenos de importância na medicina veterinária e na saúde pública. Portanto, comparou-se a proporção de gatos infectados por FIV, hemoplasmas ou *T. gondii* entre os grupos FeLV positivos e negativos. A maior presença de coinfeção dentre os FeLV positivos seria uma evidência de que esse retrovírus contribui para a contaminação por outros agentes.

Tendo em vista as principais implicações da infecção pelo FeLV, o presente trabalho propôs a existência de influências de outros patógenos capazes de potencializar as alterações causadas pelo FeLV. Nesse contexto, avaliou-se a associação da coinfeção por FeLV e hemoplasma com perdas mais acentuadas da série vermelha hematológica, e a associação da coinfeção por FIV na intensificação da imunossupressão observada em gatos FeLV positivos. Além disso, procurou-se observar se o subtipo do FeLV tem relação com alterações específicas nos parâmetros hematológicos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Foram utilizadas amostras de sangue de 267 gatos domésticos (*Felis catus*) classificados em 3 grupos de acordo com a localidade:

- Grupo 1 (G1): 42 amostras provenientes de gatos de um abrigo de animais localizado próximo à cidade do Gama-DF;
- Grupo 2 (G2): 138 amostras de gatos atendidos no Hospital Veterinário da UnB e/ou em clínicas veterinárias de Brasília.
- Grupo 3 (G3): 87 amostras de animais com acesso a rua residentes na região da Fercal, Sobradinho II- DF;

As amostras foram coletadas independente de raça, sexo, idade, condição clínica, acesso à rua ou suspeita clínica de infecção pelo FeLV.

Os métodos experimentais deste projeto foram avaliados e aprovados pelo Comitê de Ética no Uso Animal da UnB (UnBDOC nº 60044/2010).

Colheita de sangue

Os animais foram submetidos a um exame clínico inicial e posteriormente coletou-se amostras de sangue venoso por punção da veia cefálica ou jugular. As amostras foram acondicionadas em tubos com e sem EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético).

Hemograma

No laboratório de Patologia Clínica do Hospital de Pequenos Animais da UnB (Hospital Veterinário - UnB), parte das amostras com EDTA foram submetidas a hemograma completo. Utilizou-se um contador semi-automático de células para uso veterinário (ABC Vet - Horiba ABX diagnostics) para a determinação do número de hemácias, de leucócitos e a concentração de hemoglobina. Os valores do volume corpuscular médio (VCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) foram determinados por cálculo padrão. O hematócrito (VG) foi determinado pela

técnica do microhematócrito. As proteínas plasmáticas totais (PPT) foram determinadas com o auxílio do refratômetro. Foram preparados esfregaços de sangue total corados com panótico e May Giemsa Grunwald (MGG) para a realização do diferencial leucocitário e observação morfológica das células sanguíneas. As plaquetas foram diluídas em solução de Brecher (oxalato de amônio a 1%) e a contagem foi realizada em câmara de Neubauer improved®.

Estabeleceu-se como anêmicos os animais com VG abaixo de 24%, e/ou eritrócitos abaixo de $5 \times 10^6/\mu\text{l}$ e/ou hemoglobina inferior a 8,0 g/dL, de acordo com Jain (1993). Foram considerados leucopênicos os gatos com contagem total de leucócitos abaixo de $5,5 \times 10^3/\mu\text{l}$. Todos os demais valores de referência foram baseados em Jain (1993).

Teste ELISA comercial

Para a realização do teste ELISA (Snap® –CITEcombo FeLV/FIV test kit, IDEXX Systems, Portland, USA) foi obtido o soro das amostras acondicionadas em tubos sem EDTA e o resultado interpretado de acordo com as recomendações do fabricante.

Extração DNA

Após a realização do hemograma, o restante das amostras com EDTA foi mantido a -20°C para posterior extração do DNA e realização da PCR.

O DNA do sangue foi extraído com kits comerciais (QIAamp DNA blood mini kit – Qiagen e Illustra blood genomicPrep Mini Spin kit - GE healthcare), seguindo as recomendações do fabricante. As amostras de DNA foram mantidas acondicionadas a -20°C até o momento da realização da PCR.

Oligonucleotídeos e PCRs

Foram realizadas diferentes PCRs em cada amostra coletada. Após as extrações, toda amostra foi submetida à PCR para confirmação da presença

do gene da enzima GAPDH (gliceraldeído-3fosfato desidrogenase - Birkenheuer et al., 2003), para verificar a qualidade da extração, a integridade do DNA obtido e/ou a presença de inibidores da PCR. Em seguida, as amostras foram submetidas às seguintes PCRs: FeLV, FIV, hemoplasma e *Toxoplasma gondii*. Apenas as amostras positivas na PCR do FeLV foram testadas para definição dos subtipos do FeLV. Na tabela 1 estão apresentadas as sequências dos oligonucleotídeos utilizados em cada PCR.

Utilizou-se o mesmo termociclador (My Cyclor, Thermal Cycler-Biorad®) em todas as reações. Os produtos gerados nas PCRs foram analisados por eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídio e observado sob transiluminador de fluorescência ultravioleta. Um marcador molecular de 100pb (Invitrogen®) foi incluído em cada eletroforese como um padrão de comparação. O surgimento de bandas na altura dos pares de bases esperadas foi considerado o parâmetro para classificar as amostras como positivas.

Os procedimentos de preparação dos reagentes, processamento das amostras, amplificação, transferência de produto da primeira para a segunda etapa de PCR e detecção do produto amplificado foram realizados em quatro ambientes distintos para diminuir a possibilidade de contaminação.

Tabela 1. Sequências de oligonucleotídeos, gene de origem, tamanho dos produtos da amplificação e fonte consultada das reações de PCR utilizadas

Reação	Sequência 5'-3'	Gene	Tamanho produto	Fonte
FeLV				
PCR-S (S)	AGCTACTGCAGTGGTG(T/C)CATTTTC	LTR (U3)/ <i>gag</i>	927pb	Tzavaras et al., 1990
GR-1 (AS)	GACCAGTGATCAAGGGTGAG			Miyazawa et al., 1997
n-FeLV				
H20(AS)	GAAGGTCGAACTCTGGTCAACT	(U3)LTR/ <i>env</i>		Chen et al., 1998
H18 (S)	ACATATCGTCCTCCTGACCAC	<i>pol/env</i>		Chen et al., 1998
FeLV-A				
RB59(S)	CAATGTAAAACACGGGGCAC	<i>env</i>	1072pb	Chen et al., 1998
RB17(AS)	TAGTGATATTGGTTCTCTTCG	<i>env</i>		Chen et al., 1998
FeLV-B				
RB53(S)	ACTCCTCGACAACGGGAGCTAGTGAAG	<i>env</i>	866pb	Pan et al., 2005
RB17(AS)	TAGTGATATTGGTTCTCTTCG	<i>env</i>		Pan et al., 2005
FeLV-C				
RB58	AGATCTTGGGCACGTTATTCC	<i>env</i>	1755pb	Mathes et al., 1994
RB47	TTGTGAAATGGCATTGCTGC	<i>env</i>		Mathes et al., 1994
FIV				
A2	AATATGACTGTATCTACTGC	<i>gag</i>	329pb	Hondatsu et al. 1998
S2	TTTTCTTCTAGAGTACTTTCTGG	<i>gag</i>		Hondatsu et al. 1998
NS	TATTCAAACAGTAAATGGAG	<i>gag</i>		Hondatsu et al. 1998
NA	CTGCTTGTGTTCTTGAGTT	<i>gag</i>		Hondatsu et al. 1998
Hemoplasma				
HBT-R	TCGCTCCACCACTTGTTCA	16S	600pb	Criado-Fornélio et al. 2003
HBT-F	ATACGGCCCATATCCCTACG	16S		Criado-Fornélio et al. 2003
Toxoplasma gondii				
B1 F	GGAAGTGCATCCGTTGATGAG	<i>B1</i>	200pb	Burg et al. 1989
B1 R	TCTTAAAAGCGTTCGTGGTC	<i>B1</i>		Burg et al. 1989
GAPDH				
GAPDH F	CCTTCATTGACCTCAACTACAT	<i>GAPDH</i>	400pb	Birkenheyer et al., 2003
GAPDH R	CCAAAGTTGTCATGGATGACC	<i>GAPDH</i>		Birkenheyer et al., 2003

PCR FeLV

Para a realização da técnica de PCR do FeLV e subtipos do FeLV foram utilizados como controles positivos animais persistentemente infectados diagnosticados pelo teste ELISA comercial, Snap® –CITEcombo FeLV/FIV test kit, IDEXX Systems, Portland, USA, e plasmídeos contendo a sequência completa das cepas 61E FeLV-A, pFRB FeLV-B e pFSC FeLV-C (gentilmente cedidas pelo Dr. Sajal K. Ghosh, Cancer Research Center, Boston University School of Medicine, Boston, USA). Utilizou-se uma reação sem DNA como controle negativo em todas as reações.

Realizou-se duas PCRs para identificar o FeLV: na primeira, para detecção do provírus nos leucócitos do sangue periférico, utilizou-se um par de oligonucleotídeos desenhado com base na sequência do clone p61E/FeLV-A gene *gag* e da região U3 do LTR (G-R1 e PCR-S). O PCR-S foi desenhado e gentilmente cedido pelo Prof. João Pessoa Araújo Júnior (Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP-Botucatu, SP) a partir da sequência do vírus da leucemia felina já publicada por Tzavaras et al, 1990, uma vez que a região U3 é a mais divergente entre as sequências exógenas e endógenas do vírus (Berry et al, 1988). Os oligonucleotídeos amplificam o início do LTR (parte U3) até o início do gene *gag* (29-955 pb) conforme ilustrado na figura 1.

Figura 1. Diagrama do provírus do FeLV demonstrando o produto da PCR obtido a partir do LTR e parte do gene *gag*

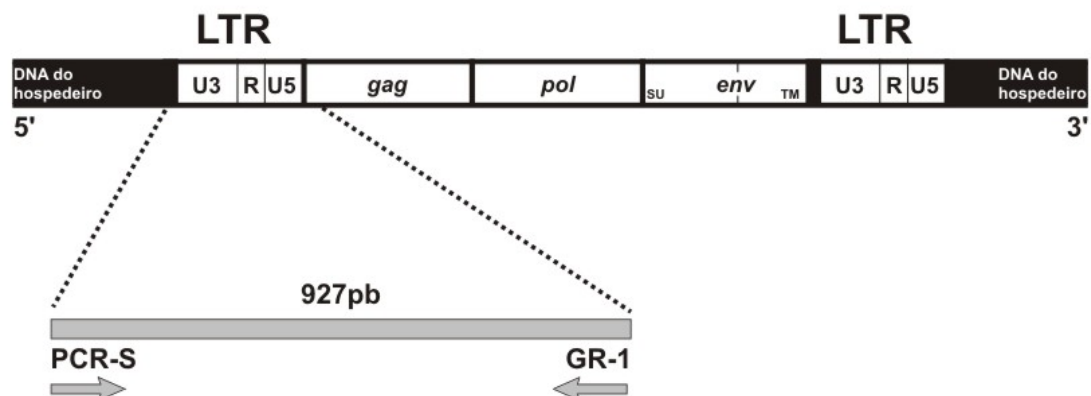


Imagem adaptada da figura 1 de Bolin et al., 2011, figura 2 de Brown et al., 2008 e figura 3 de Silva, 2007

A amplificação da reação utilizou o protocolo do tipo “Touch Down”, na qual há redução gradual da temperatura de aneamento em cada ciclo, e seguiu a padronização feita pelo Prof. João Pessoa Araújo Júnior no Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP-Botucatu, SP. Na etapa inicial, após prévio aquecimento da tampa por 2 minutos, as amostras foram incubadas a 94°C por 5 minutos para ocorrer a desnaturação. Em seguida, as amostras passaram por 11 ciclos de: 94°C por 1 minuto para a desnaturação da fita de DNA, 64°C por 1 minuto para a hibridização dos oligonucleotídeos (diminuindo 1°C por ciclo) e 72°C por 1:30 minutos para a extensão das fitas. Ao término desta etapa, foram realizados 23 ciclos de: 94°C por 1 minuto, 53°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto. Ao final, foi realizada a extensão final a 72°C por 5 minutos. Esta PCR gerou um produto final de 927 pares de bases.

***nested* PCR subtipos FeLV (A, B, C)**

A segunda PCR para o FeLV, realizada nos animais com resultado positivo na primeira PCR, foi uma PCR *nested* (n-PCR) para detectar os subtipos de FeLV. Na primeira etapa da reação utilizou-se oligonucleotídeos externos, H20 e H18 (Chen et al. 1998), que se anelam nas sequências do gene *pol* (em direção ao gene *env*) e da região U3 (Coelho et al, 2008.), portanto amplificam todo o gene *env* e a região U3 do LTR 3'.

Os oligonucleotídeos internos utilizados amplificam segmentos do gene *env*, que diferenciam os subtipos do FeLV. Dois µl do produto da primeira reação foram usados na segunda etapa com oligonucleotídeos específicos para cada subtipo: RB59 e RB17, para FeLV-A, que gera um produto de PCR de 1072pb (Chen et al, 1998); RB53 e RB17, específico para FeLV-B - produto de 866pb (Pan et al, 2005) e RB58 e RB47 - específico para FeLV-C, que gera um produto de 1755pb (Mathes et al., 1994, Coelho et al.,2008). Cada subtipo foi testado em reações independentes (figura 2). Não foram feitos testes para detecção do subtipo T.

As condições de amplificação foram determinadas experimentalmente durante o projeto e permaneceram iguais para as duas etapas do n-PCR (94°C por 5' seguidos por 35 ciclos de: 94°C por 1', um minuto na

temperatura de anelamento específica e 72°C por 1:30 minutos e incubação final a 72°C por 5 minutos), diferindo apenas nas temperaturas de anelamento, que foram calculadas de acordo com as sequências dos oligonucleotídeos. Os produtos foram mantidos a 4°C.

Em todas as reações da PCR para FeLV as concentrações dos reagentes da mistura da PCR foram as mesmas: aproximadamente 10 ng DNA, 2mM MgCl₂, 1X tampão de PCR, 1,00µl de cada oligonucleotídeo (10 pmol), 0,2mM de cada dNTP, 5UI de *Taq* DNA polimerase e água miliQ para um volume final de 25 µl.

Figura 2. Diagrama do provirus do FeLV demonstrando os produtos das n-PCRs obtidos a partir do gene *env* no primeiro e segundo rounds para cada subtipo do FeLV

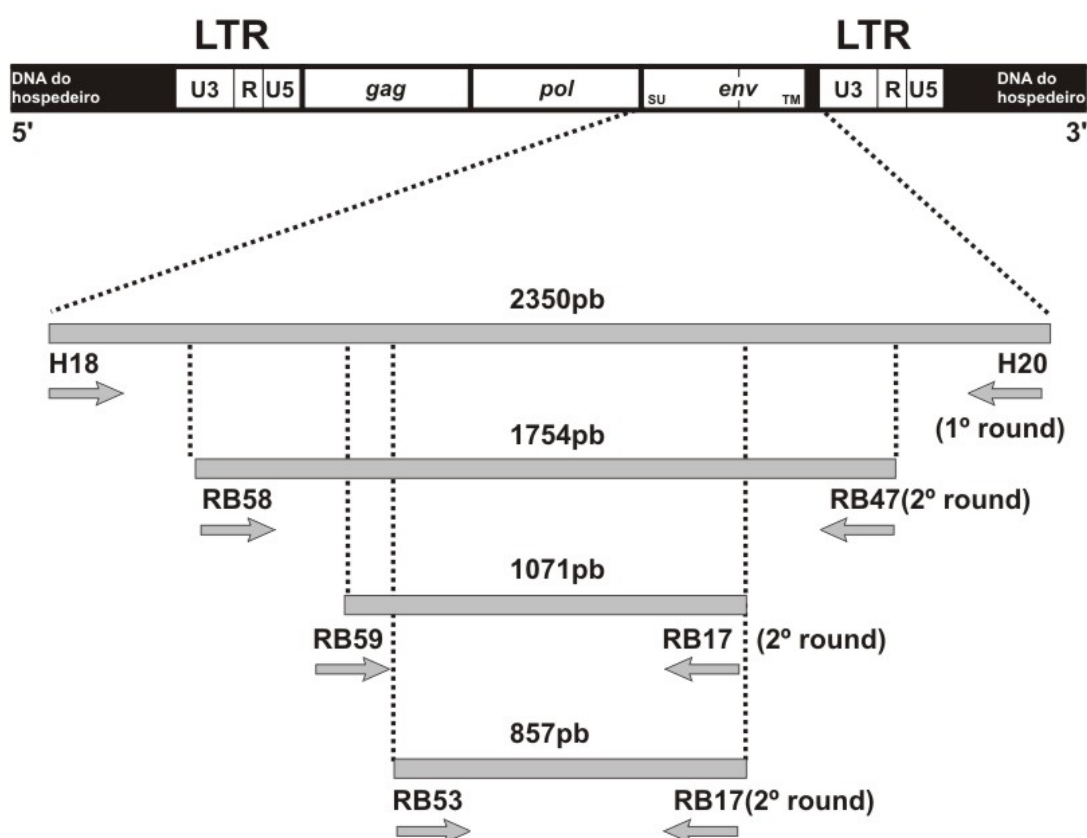


Imagem adaptada da figura 1 de Bolin et al., 2011, figura 2 de Brown et al., 2008 e figura 3 de Silva, 2007

PCR *Toxoplasma gondii*

A detecção da coinfeção pelo *Toxoplasma gondii* foi feita por PCR com a utilização dos oligonucleotídeos B1F e B1R (tabela 1) específicos para o gene *B1* do protozoário, que geram um produto de 194 pb, de acordo com Burg et al., 1989. A reação do mix foi composta de 1X tampão de PCR, 10 ng de DNA amostra, 2 mM MgCl₂, 0,2 mM de cada deoxinucleotídeo, 1 μM de cada oligonucleotídeo e 0,8 U de *Taq* DNA polimerase em um volume final de 25 μL. O protocolo de amplificação foi composto de uma etapa de desnaturação de inicial de 94°C por 5 minutos seguida de 30 ciclos de amplificação (desnaturação 94°C por 1 minuto, anelamento a 55°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 45 segundos) e extensão final de 72°C por 10 minutos.

PCR FIV

A identificação do FIV foi realizada por meio de n-PCR. Utilizou-se 2 pares de oligonucleotídeos específicos para o gene *gag* do FIV, cujo produto final é de 329 pb (tabela 1). As reações das duas etapas eram compostas por: 1X tampão de PCR, 10 ng de DNA amostra, 2 mM MgCl₂, 0,2 mM de cada deoxinucleotídeo, 1 μM de cada oligonucleotídeo e 0,8 U de *Taq* DNA polimerase em um volume final de 25 μL. As condições de amplificação para ambas foram: desnaturação de inicial de 95°C por 5 minutos seguida de 30 ciclos de amplificação (95°C por 45 segundos, 58°C por 45 segundos e 72°C por 45 segundos) e extensão final de 72°C por 5 minutos, de acordo com o descrito por Hondatsu et al. (1998).

PCR hemoplasmas

Para verificar a presença de hemoplasmas (*Candidatus Mycoplasma haemominutum* ou *M. haemofelis*) foram utilizados os oligonucleotídeos HBT-F e HBT-R que se anelam no gene 16S RNA gerando um produto de aproximadamente 600 pb (tabela 1). A reação do mix foi composta de 1X tampão de PCR, 10 ng de DNA amostra, 2 mM MgCl₂, 0,2 mM de cada

deoxinucleotídeo, 1 μ M de cada oligonucleotídeo e 0,8 U de *Taq* DNA polimerase em um volume final de 25 μ L. O protocolo de amplificação foi composto de uma etapa de desnaturação de inicial de 94°C por 10 minutos seguida de 30 ciclos de amplificação (94°C por 30 segundos, 56°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos) e extensão final de 72°C por 10 minutos, de acordo com o descrito por Criado-Fornélio et al. (2003).

PCR GAPDH

Após as extrações, toda amostra foi submetida à PCR com oligonucleotídeos específicos (tabela 1) para o gene da enzima GAPDH (gliceraldeído-3 fosfato desidrogenase). A reação do mix foi composta de 1X tampão de PCR, 10 ng de DNA amostra, 2 mM $MgCl_2$, 0,2 mM de cada deoxinucleotídeo, 1 μ M de cada oligonucleotídeo e 0,8 U de *Taq* DNA polimerase em um volume final de 25 μ L. O protocolo de amplificação foi composto de uma etapa de desnaturação de inicial de 95°C por 5 minutos seguida de 40 ciclos de amplificação (94°C por 30 segundos, 52°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto) e extensão final de 72°C por 5 minutos, de acordo com o descrito por Birkenheyer et al. (2003).

Análise estatística

A análise estatística foi realizada com os softwares Microsoft® Excel e Stata 12®. A avaliação estatística inferencial dos parâmetros hematológicos foi feita a partir da comparação do percentual de animais que estavam acima, dentro ou abaixo dos valores de referência. Enquanto a avaliação estatística descritiva dos parâmetros hematológicos foi feita por meio da média e desvio padrão.

O teste t-student foi utilizado para comparar os valores médios dos parâmetros hematológicos estudados. A diferença de proporções entre resultados anormais e normais para gatos positivos e negativos para cada enfermidade foram verificadas pelo teste χ^2 com correção de Yates ou o teste Exato de Fisher. Somente as variáveis que possuíram um $p \leq 0,05$ nestes testes foram consideradas estatisticamente significativas.

A estimativa de prevalência de gatos positivos para as diferentes enfermidades e coinfeções foi calculada pela divisão do número de amostras positivas pelo total de amostras testadas e os intervalos de 95% de confiança para estas medidas de frequência foram calculados usando a distribuição binomial exata.

Diante da presença de associação entre a positividade para FeLV e algumas alterações hematológicas, a mensuração de quantas vezes foi maior o risco de animais positivos para FeLV apresentarem padrões hematológicos alterados em relação àqueles que são negativos para a doença foi estimada pelo cálculo da razão de chances ou Odds Ratio (OR) e seu IC de 95% para cada variável. A base de comparação para o cálculo dessa medida de associação foi sempre o padrão de normalidade.

O teste kappa foi usado para avaliar a concordância além daquela esperada ao acaso entre a PCR para FeLV e o ELISA comercial. O valor de kappa igual a 1 indica concordância perfeita entre os testes, enquanto valor kappa igual a 0 indica o nível de concordância esperado ao acaso. A interpretação dos valores de kappa foi baseada na interpretação sugerida por Dohoo et al, 2003 ($k \leq 0,2$ indica fraca concordância, $0,21-0,4$ razoável, $0,41-0,6$ moderado, $0,61-0,8$ substancial e $\geq 0,81$ quase perfeito e 1,00 indica concordância perfeita).

RESULTADOS

Foram analisadas as amostras de 267 animais (42 gatos no G1, 138 no G2 e 87 no G3), dos quais 50,2% eram fêmeas e 49,8% machos. A idade média foi de 6,6 anos, oscilando entre 1 e 16 anos.

Na Tabela 2 estão apresentadas as características referentes a sexo, idade e acesso à rua em cada grupo amostrado.

Tabela 2. Total de animais de acordo com cada característica avaliada separados conforme o grupo de amostras coletadas no Distrito Federal entre 2010 e 2011

Característica	G1	G2	G3	Total
Total de gatos avaliados	42	138	87	267
< 3 anos	-	21	21	42
3-6 anos	-	23	2	25
> 6 anos	-	48	7	55
Não informado	42	45	57	144
Gênero				
Fêmeas	25	61	37	123
Machos	11	64	47	122
Não informado	6	12	3	21

G1 - gatos provenientes de abrigo, G2 - gatos atendidos no Hospital Veterinário da UnB e/ou em clínicas veterinárias, G3 - gatos domiciliados região periurbana

As comparações das proporções dessas características entre gatos FeLV positivos e FeLV negativos estão resumidas na tabela 3.

Tabela 3. Proporções e comparação entre animais positivos (FeLV+) e negativos (FeLV-) na PCR de acordo com sexo, idade e acesso à rua

Característica	FeLV+	FeLV-	Valor p
Sexo			
macho	41,5%	47,6%	0,425
fêmea	37,7%	47,6%	0,195
Idade			
< 3 anos	13,2%	16,8%	0,523
3-6 anos	16,9%	9,3%	0,110
> 6 anos	15%	19,1%	0,499
Acesso à rua			
sim	22,6%	50%	0,0003
não	18,8%	11,6%	0,163

A comparação de cada característica dentre os gatos com FeLV não demonstrou diferença significativa, exceto para a variável "acesso à rua".

Os controles positivos de todas as PCRs testadas (FeLV, subtipos FeLV, hemoplasmas, *T. gondii*, FIV e GAPDH) sempre apresentaram formação de bandas na altura de pares de bases esperadas para a seqüência amplificada. Os controles negativos não demonstraram sinais de amplificação (figura 3).

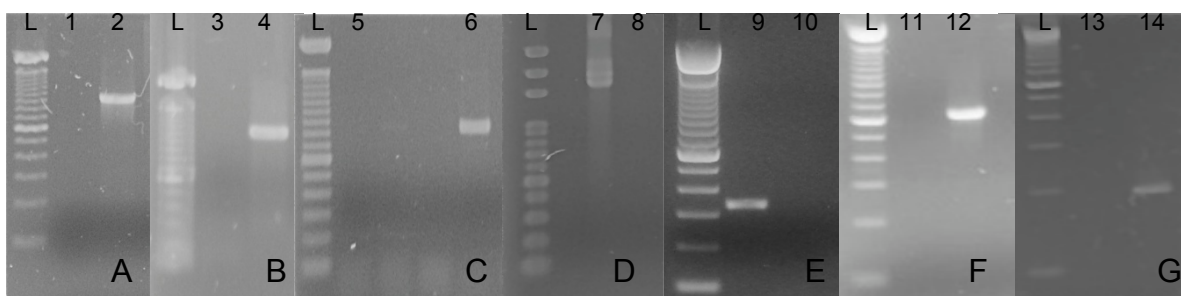


Figura 3. Eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídio 0,01% dos resultados dos controles positivos das PCRs realizadas (A: PCR FeLV, B: PCR FeLV-A, C: PCR FeLV-B, D: PCR FeLV-C, E: PCR FIV, F: PCR hemoplasma, G: PCR *T. gondii*). L: marcador molecular de 100pb. #1, 3, 5, 8, 10, 11 e 13: controles negativos. #2 (A): controle positivo FeLV, #4 (B): controle positivo FeLV-A, #6 (C): controle positivo FeLV-B, #7 (D): controle positivo FeLV-C, #9 (E): controle positivo FIV, #12 (F): controle positivo hemoplasma e #14 (G): controle positivo *T. gondii*

Os resultados das PCRs de cada infecção de acordo com o grupo de coleta está apresentado na tabela 4.

Tabela 4. Total de animais positivos pela PCR para FeLV, FIV, hemoplasmas e *Toxoplasma gondii* de acordo com grupo de amostras coletadas no Distrito Federal entre 2010 e 2011

Infecção	Positivos/total	% e IC
G1		
FeLV	16/42	38% (23,1-53%)
FIV	2/42	4,7% (0,58-16,1%)
Hemoplasma	4/42	9,5% (2,6-22,6%)
<i>Toxoplasma gondii</i>	0/42	0
G2		
FeLV	37/138	26,8% (19,3-34,2%)
FIV	4/138	2,8% (0,07-7,2%)
Hemoplasma	30/138	21,5% (15-29,3%)
<i>Toxoplasma gondii</i>	0/138	0
G3		
FeLV	0/87	0
FIV	0/87	0
Hemoplasma	30/87	34,5% (24,5-44,5%)
<i>Toxoplasma gondii</i>	0/87	0

G1 - gatos provenientes de abrigo , G2 - gatos atendidos no Hospital Veterinário da UnB e/ou em clínicas veterinárias, G3 - gatos domiciliados região periurbana, IC=intervalo de confiança

A tabela 5 ilustra o percentual e a comparação estatística de cada infecção de acordo com o grupo amostrado. A comparação da proporção do FeLV entre os 3 grupos amostrados (G1 x G2 x G3) demonstrou diferença significativa ($p < 0.0001$), contudo, essa diferença foi devido ao grupo G3, onde todos os animais foram negativos, logo, o G3 foi excluído dessas comparações, uma vez que não foram encontrados animais com FIV, FeLV ou *T. gondii*. Com isso, não houve diferença nas proporções de animais com FeLV, FIV, hemoplasma e *T. gondii* entre os grupos G1 e G2.

Tabela 5. Proporção de cada infecção dentre os grupos de coleta e significância estatística (p) entre as proporções de G1 e G2

Infecção/Grupo	G1	G2	Valor p
FeLV	38% (23,1-53%)	26,8% (19,3-34,2%)	0,160
FIV	4,7% (0,58-16,1%)	2,8% (0,07-7,2%)	0,543
Hemoplasma	9,5%(2,6-22,6%)	21,5% (15-29,3%)	0,080
<i>Toxoplasma gondii</i>	0	0	-

G1 - gatos provenientes de abrigo , G2 - gatos atendidos no Hospital Veterinário da UnB e/ou em clínicas veterinárias

Coinfecções

O grupo G3 foi excluído das comparações de proporções de coinfecções, uma vez que nenhum dos animais deste grupo foi positivo para FeLV, logo, poderiam inserir desvios nos resultados.

A tabela 6 representa os percentuais das infecções por hemoplasmas e FIV nos animais FeLV positivos e FeLV negativos e a significância estatística entre eles, e na Tabela 7 há esta mesma distribuição dentro de cada grupo amostral. Não houve diferença nas proporções de animais com FIV ou hemoplasmas entre os gatos FeLV positivos e negativos ou entre os grupos amostrados.

Tabela 6. Comparação do percentual de animais com FIV, hemoplasmas e *T. gondii* no grupo de gatos FeLV negativos e nos gatos FeLV positivos de acordo com os resultados da PCR

Infecção/PCR FeLV	FeLV Negativos	FeLV Positivos	OR	Valor p
FIV	2/180 (1%)	4/53 (7,55%)	5,1 (0,9-28,7)	0,06
Hemoplasma	19/127 (14,9%)	15/53 (28,3%)	2,24 (1,04-4,85)	0,06
<i>Toxoplasma gondii</i>	0	0	-	-

OR=odds ratio

Tabela 7. Comparação da infecção por FIV e hemoplasma dentro do grupo de animais FeLV positivo e FeLV negativo de acordo com o grupo de coleta

Infecção/ Grupo	G1		G2		Valor p
	FeLV+	FeLV-	FeLV+	FeLV-	
FIV	12,5%(1,6-38,3%)	0	2,9%(0,1-14,9%)	2,7%(0,3-9,5%)	0,949
Hemoplasma	25%(3,8-46,2%)	0	22,9%(8,9-36,8%)	23,3%(13,6-33%)	0,675

G1 - gatos provenientes de abrigo , G2 - gatos atendidos no Hospital Veterinário da UnB e/ou em clínicas veterinárias

Na tabela 8 observa-se o percentual das coinfecções dentro do total de animais amostrados e dentre os animais FeLV positivos, enquanto as tabelas 9 e 10 demonstram esses mesmos dados divididos de acordo com o grupo. A avaliação dos intervalos de confiança permite determinar que não há diferença entre as proporções.

Tabela 8. Total e percentual de animais com coinfeção dentre todos os animais amostrados e dentre os animais FeLV positivos

Infecção	População total	IC	FeLV Positivos	IC
FeLV/FIV	4/181 (2,2%)	0,4-3,7%	4/53 (7,55%)	0,19-14,8%
FeLV/hemoplasma	15/181 (8,2%)	2,8-8,3%	15/53 (28,3%)	16,2-40,4%
FeLV/ <i>Toxoplasma gondii</i>	0	0	0	0
FeLV/FIV/hemoplasma	(3/181)1,6%	0,2-3,2%	5,56%	1,2-15,7%

IC=intervalo de confiança

Tabela 9. Total e percentual de animais com coinfeção em cada grupo amostrado e dentre gatos FeLV positivos na PCR

Infecção/Grupo	Total	IC	Coinfeções FeLV Positivos	IC	Valor p
G1					
FeLV/FIV	2/42 (4,7%)	0,6-16,2%	2/16 (12,5%)	1,6-38,3%	0,293
FeLV/Hemoplasma	4/42 (9,5%)	0,49-18,5%	4/16 (25%)	3,8-46,2%	0,125
FeLV/ <i>Toxoplasma gondii</i>	0/42	-	0/16	-	-
G2					
FeLV/FIV	2/138 (1,4%)	0,2-5,1%	2/37 (5,4%)	0,7-18,2%	0,144
FeLV/Hemoplasma	9/138 (6,5%)	2,4-10,6%	9/37 (24,3%)	10,5-38,1%	0,001
FeLV/ <i>Toxoplasma gondii</i>	0/143	-	0/39	-	-

G1 - gatos provenientes de abrigo , G2 - gatos atendidos no Hospital Veterinário da UnB e/ou em clínicas veterinárias, IC= intervalo de confiança

Tabela 10. Proporções e comparação das coinfeções de acordo com os grupos amostrados

Coinfeção	G1	G2	Valor p
FeLV/FIV	4,7% (0,6-16,2%)	1,4% (0,2-5,1%)	0,199
FeLV/hemoplasma	9,5% (0,49-18,5%)	7,9% (3,3-12,4%)	0,740
FeLV/ <i>Toxoplasma gondii</i>	0	0	-
FeLV/FIV/hemoplasma	1	2	0,675

G1 - gatos provenientes de abrigo , G2 - gatos atendidos no Hospital Veterinário da UnB e/ou em clínicas veterinárias

Subtipos

O resultado dos subtipos dentre os animais FeLV positivos de acordo com a PCR estão apresentados nas tabelas 11.

Tabela 11. Subtipos de FeLV encontrados de acordo com a n-PCR nos gatos positivos na primeira PCR (FeLV+)

Subtipo	Subtipo/FeLV+	IC
FeLV-A	21/53 (39,6%)	26-53,2%
FeLV-B	1/53 (1,9%)	0-10,1%
FeLV-AB	29/53 (54,7%)	40,8-68,5%
Nenhum subtipo	2/53 (3,8%)	0,5-13%

IC=intervalo de confiança

Não foram encontrados animais com o subtipo C ou a combinação entre os três subtipos (ABC).

O resultado dos subtipos de acordo com o grupo de coleta estão apresentados nas tabelas 12. A tabela 13 demonstra os resultados da comparação das proporções de cada subtipo entre os grupos.

Tabela 12. Subtipos de FeLV encontrados de acordo com a n-PCR nos gatos positivos na primeira PCR (FeLV+) conforme o grupo amostrado

Subtipo/Grupo	Subtipo/FeLV+	IC
G1		
FeLV-A	6/16 (37,5%)	13,8-61,2%
FeLV-B	0	0
FeLV-AB	10/16 (62,5%)	38,8-86,2%
Nenhum subtipo	0	0
G2		
FeLV-A	15/35 (42,9%)	26,5-59,3%
FeLV-B	1/35 (2,9%)	0,1-14,9%
FeLV-AB	20/35 (57,1%)	40,7-73,5%
Nenhum subtipo	2/35 (5,7%)	0,7-19,2%

G1 - gatos provenientes de abrigo , G2 - gatos atendidos no Hospital Veterinário da UnB e/ou em clínicas veterinárias, IC=intervalo de confiança

Tabela 13. Proporção de animais FeLV-A e FeLV-AB de acordo com o grupo

Subtipo/Grupo	G1	G2	Valor p
FeLV-A	37,5% (13,8-61,2%)	42,9% (26,5-59,3%)	0,716
FeLV-AB	62,5%(38,8-86,2%)	57,1% (40,7-73,5%)	0,716

G1 - gatos provenientes de abrigo , G2 - gatos atendidos no Hospital Veterinário da UnB e/ou em clínicas veterinárias

Comparação entre PCR e ELISA

Obteve-se 70 animais testados pelo ELISA comercial. Os resultados dos animais testados pela PCR e ELISA para o FeLV estão resumidos na tabela 14. O teste kappa revelou concordância de 91,3% entre os dois testes ($k=0,8085$) em relação ao diagnóstico do FeLV.

Tabela 14. Resultados da PCR FeLV versus detecção da p27 pelo ELISA

		PCR FeLV		Total
		(+)	(-)	
p27 ELISA*	(+)	21 (30%)	7 (10%)	28 (37,2%)
	(-)	2 (2,8%)	40 (57,2%)	42 (62,8%)
Total		23 (32,8%)	47 (67,2%)	70 (100%)

Valor kappa=0,8085 (concordância substancial)

*enzyme-linked immunoabsorbent assay (Snap® –CITEcombo FeLV/FIV test kit, IDEXX Systems, Portland, USA)

+ (resultado positivo)

- (resultado negativo)

Hematológico

Os resultados dos hemogramas de cada grupo divididos em animais FeLV positivos e FeLV negativos de acordo com a PCR estão apresentados na tabela 15. Observou-se diferença significativa entre os 3 grupos (G1, G2, G3) em todas as proporções dos parâmetros hematológicos, exceto monócitos.

A Tabela 16 demonstra a média e desvio padrão dos parâmetros hematológicos para animais FeLV positivos e FeLV negativos e a tabela 17 apresenta o percentual de animais acima, dentro e abaixo dos valores de referência para cada padrão hematológico acompanhados das estimativas estatísticas.

Tabela 16. Média, desvio padrão e comparação dos valores hematológicos entre os animais FeLV positivos (FeLV+) e negativos (FeLV-) identificados por meio da PCR

Parâmetros	FeLV+		FeLV-		Valores de referência ^a	FeLV+ x FeLV-
	Média	DP	Média	DP		Valor p
VG (%)	24	10,23	30,58	7,46	24-45	<0,001
Hemácias (x10 ⁶ /μl)	5,95	2,8	7,75	2,21	5,0-10	<0,001
Hemoglobina (g/dL)	8,77	4,28	11,32	3,07	8,0-15	<0,001
VCM (fl)	42,44	8,68	40,82	9,05	39-55	0,043
CHCM (%)	35,35	8,27	37,6	6,46	30-36	<0,001
Leucócitos (μl)	16.210	11.115	14.470	8.240	5.500-19.500	0,062
Segmentados	10.353	9.148	9.364	6.662	2.500-12.500	0,512
Linfócitos	4.247	4.888	3.472	2.696	1.500-7.000	0,062
Monócitos (μl)	408	636	356	480	0-850	0,884
Eosinófilos (μl)	954	1.567	1.250	1.159	0-1500	0,301
PPT (g/dL)	7,21	1,24	7,18	0,97	6,0-8,0	1
Plaquetas	290.755	177.653	345.000	168.418	195.000-624.000	0,053

^aJain, 1993, DP=desvio padrão, diferença estatística significativa, VG= volume globular, VCM=volume corpuscular médio, CHCM=concentração de hemoglobina corpuscular média, PPT=proteínas plasmáticas totais

Tabela 15. Média e desvio padrão dos parâmetros hematológicos dos animais FeLV positivos (FeLV+) e negativos (FeLV-) identificados por meio da PCR e agrupados por local de coleta (G1, G2, G3)

Parâmetro	G1						G2						G3		Valores de referência ^a
	Total		FeLV+		FeLV-		Total		FeLV+		FeLV-		Total		
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	
VG (%)	33	5,3	30,3	3,7	34,4	5,4	26,2	11,1	20,3	10,7	29,4	9,8	30	5,4	24-45
Hemácias (x10 ⁶ /µl)	8,9	1,8	8,1	1,5	9,4	1,7	5,8	2,6	4,7	2,6	6,5	2,3	8,0	1,7	5,0-10
Hemoglobina (g/dL)	13,2	2,5	12,5	2,2	13,7	2,5	8,6	3,6	6,7	3,7	9,6	3,2	11,7	2,4	8,0-15
VCM (fl)	37,8	6,0	38,7		37,2	5,5	46,2	11,7	44,3	9,0	47	11,5	37,6	4,6	39-55
CHCM (%)	40,5	7,2	41,1	8,7	40,2	6,6	33,2	1,8	32,3	6,7	32,8	3,4	39,4	6,4	30-36
Leucócitos (x10 ³ /µl)	22,7	9,9	25,1	11,7	21,1	8,5	11,3	7,8	11,2	7,0	11,4	8,4	14,4	6,6	5,5-19,5
Segmentados (x10 ³ /µl)	14,7	8,6	16,8	11,2	13,4	6,5	7,9	7,2	6,7	5,1	8,6	8,1	8,5	4,8	2,5-12,5
Linfócitos (x10 ³ /µl)	5,3	3,7	5,2	4,6	5,4	3,2	2,5	3,2	3,6	4,9	1,8	1,5	3,9	2,5	1,5-7,0
Monócitos (x10 ³ /µl)	0,2	0,3	0,2	0,2	0,2	0,3	0,4	0,6	0,4	0,7	0,3	0,5	0,3	0,4	0-0,85
Eosinófilos (x10 ³ /µl)	2,0	1,7	2,0	2,0	2,0	1,4	0,5	0,6	0,2	0,4	0,5	0,7	1,4	1,04	0-1,5
PPT (g/dL)	8,3	0,8	8,3	0,7	8,4	0,8	6,7	0,9	6,5	1,0	6,7	0,9	7,0	0,7	6,0-8,0
Plaquetas (x10 ⁵ /µl)	3,49	1,15	3,65	1,23	3,38	1,12	3,23	2,05	2,46	1,9	3,52	2,04	3,41	1,56	1,95-6,24

^aJain, 1993, VG= volume globular, VCM=volume corpuscular médio, CHCM=concentração de hemoglobina corpuscular média, PPT=proteínas plasmáticas totais, DP=desvio padrão, G1=gatos provenientes de abrigo, G2= gatos atendidos no Hospital Veterinário da UnB e/ou em clínicas veterinárias, G3=gatos com acesso à rua de região periurbana Fercal

Tabela 17. Proporção de gatos com valores hematológicos acima, dentro e abaixo dos valores de referência, e comparação, OR e IC das proporções entre gatos FeLV positivos (FeLV+) e negativos (FeLV-) na PCR

Parâmetro hematológico		FeLV+ (%)	FeLV- (%)	Valor p	OR (IC 95%)
VG (%)	Abaixo	39,13	12,2	<0,0001	4,59 (2-10,42)
	Normal	60,87	86,67	-	-
	Acima	0	1,21	0,9	0,49 (0,02-10,48)
Hemácias (x10 ⁶ /µl)	Abaixo	28,26	9,09	0,003	3,77 (1,47-9,44)
	Normal	67,39	81,82	-	-
	Acima	4,35	9,09	0,38	0,39 (0,08-1,88)
Hemoglobina (g/dL)	Abaixo	39,13	12,12	<0,0001	4,46 (1,92-10,23)
	Normal	56,52	78,18	-	-
	Acima	4,35	9,70	0,4	0,4 (0,08-1,93)
VCM (fl)	Abaixo	32,61	48,48	0,69	1,28 (0,58-2,84)
	Normal	58,70	47,27	-	-
	Acima	8,70	4,24	0,87	1,12 (0,3-4,17)
CHCM (%)	Abaixo	8,70	7,27	0,79	0,7 (0,2-2,41)
	Normal	58,70	41,82	-	-
	Acima	32,61	50,91	0,5	1,44 (0,64-3,26)
Leucócitos (µl)	Abaixo	13,33	8,48	0,87	0,94 (0,32-2,79)
	Normal	53,33	69,70	-	-
	Acima	33,33	21,82	0,49	1,46 (0,64-3,32)
Segmentados	Abaixo	13,33	5,49	0,47	1,89 (0,56-6,42)
	Normal	62,22	69,51	-	-
	Acima	24,44	25,00	0,91	0,87 (0,37-2,03)
Linfócitos	Abaixo	24,44	23,17	0,37	0,62 (0,27-1,45)
	Normal	60,00	66,46	-	-
	Acima	15,56	10,37	0,54	1,7 (0,54-5,38)
Monócitos (µl)	Normal	88,64	90,12	-	-
	Acima	11,36	9,88	0,79	1,03 (0,32-3,27)
Eosinófilos (µl)	Normal	73,81	70,63	-	-
	Acima	26,19	29,38	0,91	1,05 (0,44-2,46)
PPT (g/dL)	Abaixo	11,11	8,02	0,77	1 (0,3-3,25)
	Normal	64,44	74,07	-	-
	Acima	24,44	17,90	0,97	0,9 (0,38-2,11)
Plaquetas	Abaixo	25,58	19,38	0,75	1,27 (0,53-3,06)
	Normal	69,77	75,00	-	-
	Acima	4,65	5,63	0,91	0,66 (0,12-3,45)

OR=odds ratio, IC=intervalo de confiança, VG= volume globular, VCM=volume corpuscular médio, CHCM=concentração de hemoglobina corpuscular média, PPT=proteínas plasmáticas totais

Os resultados e comparações das análises hematológicas entre gatos FeLV positivos com coinfeção por hemoplasma e gatos FeLV positivos sem

coinfecção por hemoplasma estão representados na tabela 18. Não houve diferença nas proporções dos padrões hematológicos na comparação entre esses dois grupos.

Tabela 18. Média, desvio padrão e comparação das médias dos valores hematológicos dos animais FeLV positivos (FeLV+) com coinfecção por hemoplasma (hemoplasma+) e FeLV positivos sem coinfecção por hemoplasma (hemoplasma -) identificados por meio da PCR

Parâmetros	Hemoplasma +		Hemoplasma -		Valores de referência ^a	Valor p	
	FeLV+	Média	DP	Média			DP
VG (%)		23,08	9,39	24	10,23	24-45	0,514
Hemácias (x10 ⁶ /µl)		5,5	2,6	5,95	2,8	5,0-10	0,37
Hemoglobina (g/dL)		8,25	3,58	8,77	4,28	8,0-15	0,388
VCM (fl)		44,9	8,72	42,44	8,68	39-55	0,131
CHCM (%)		35,34	2,34	35,35	8,27	30-36	0,679
Leucócitos (x10 ³ /µl)		14,66	11,22	16.210	11.115	5,5-19,5	0,625
Segmentados (x10 ³ /µl)		9.489	8.242	10.353	9.148	2.500-12.500	0,699
Linfócitos (x10 ³ /µl)		4.056	5.956	4.247	4.888	1.500-7.000	0,814
Monócitos (x10 ³ /µl)		208	233	408	636	0-850	0,233
Eosinófilos (x10 ³ /µl)		783	1.068	954	1.567	0-1500	0,739
PPT (g/dL)		7,43	1,06	7,21	1,24	6,0-8,0	0,341
Plaquetas		265.818	166.563	290.755	177.653	195.000-624.000	0,53

^aJain, 1993, VG= volume globular, VCM=volume corpuscular médio, CHCM=concentração de hemoglobina corpuscular média, PPT=proteínas plasmáticas totais, DP=desvio padrão

Na tabela 19 observam-se os resultados das análises e comparações hematológicas entre gatos FeLV positivos com coinfecção por FIV e gatos FeLV positivos sem coinfecção por FIV. Não houve diferença nas proporções dos padrões hematológicos na comparação entre esses dois grupos. A comparação entre as médias de gatos FeLV positivos com coinfecção por FIV e gatos negativos na PCR para FeLV demonstrou diferença significativa na PPT, maior para FeLV/FIV.

Tabela 19. Média, desvio padrão e comparação das médias dos valores hematológicos dos animais FeLV positivos (FeLV+) com coinfeção por FIV (FIV+) e FeLV positivos sem coinfeção por FIV (FIV-) identificados por meio da PCR

Parâmetros	FIV +		FIV -		Valores de referência ^a	Valor p	
	FeLV+	Média	DP	Média			DP
VG (%)		29	9,64	24	10,23	24-45	0,346
Hemácias (x10 ⁶ /µl)		6,53	2,55	5,95	2,8	5,0-10	0,689
Hemoglobina (g/dL)		11,33	4,82	8,77	4,28	8,0-15	0,256
VCM (fl)		45,39	3,98	42,44	8,68	39-55	0,505
CHCM (%)		38,03	4,72	35,35	8,27	30-36	0,527
Leucócitos (x10 ³ /µl)		7,9	2,38	16,2	11,1	5,5-19,5	0,144
Segmentados (x10 ³ /µl)		5501	1998	10.353	9.148	2.500-12.500	0,298
Linfócitos (x10 ³ /µl)		1991	2139	4.247	4.888	1.500-7.000	0,366
Monócitos (x10 ³ /µl)		100	97	408	636	0-850	0,341
Eosinófilos (x10 ³ /µl)		303	263	954	1.567	0-1500	0,414
PPT (g/dL)		8,46	0,75	7,21	1,24	6,0-8,0	0,052
Plaquetas		337.333	206.012	290.755	177.653	195.000-624.000	0,618

^aJain, 1993, VG= volume globular, VCM=volume corpuscular médio, CHCM=concentração de hemoglobina corpuscular média, PPT=proteínas plasmáticas totais, DP=desvio padrão

As análises e comparações hematológicas entre gatos FeLV-A e FeLV-AB estão representados na tabela 20. A avaliação hematológica dos subtipos de FeLV demonstrou que, de acordo com as proporções, nenhum parâmetro hematológico diferiu entre FeLV-A e FeLV-AB.

Tabela 20. Média, desvio padrão e comparação das médias dos valores hematológicos dos animais FeLV-A e FeLV-AB identificados por meio da PCR

Subtipo	FeLV-A		FeLV-AB		Valores de referência ^a	Valor p
	Parâmetros	Média	DP	Média		
VG (%)	26,6	7,9	22,3	11,3	24-45	0,156
Hemácias (x10 ⁶ /µl)	6,6	2,2	5,4	3,0	5,0-10	0,141
Hemoglobina (g/dL)	10,0	3,8	8,0	4,4	8,0-15	0,111
VCM (fl)	41,6	8,9	44,5	9,2	39-55	0,285
CHCM (%)	37,3	8,5	35,2	3,5	30-36	0,240
Leucócitos (x10 ³ /µl)	14,8	9,8	15,2	10,8	5,5-19,5	0,897
Segmentados (x10 ³ /µl)	8607	6305	10000	9203	2.500-12.500	0,567
Linfócitos (x10 ³ /µl)	4728	6023	3729	3850	1.500-7.000	0,486
Monócitos (x10 ³ /µl)	344	377	381	744	0-850	0,842
Eosinófilos (x10 ³ /µl)	511	666	1301	1900	0-1500	0,089
PPT (g/dL)	7,1	1,2	7,3	1,3	6,0-8,0	0,593
Plaquetas	261.666	139.291	318.833	196.330	195.000-624.000	0,277

^aJain, 1993, VG= volume globular, VCM=volume corpuscular médio, CHCM=concentração de hemoglobina corpuscular média, PPT=proteínas plasmáticas totais, DP=desvio padrão

DISCUSSÃO

Este estudo foi o primeiro relato a respeito da ocorrência do FeLV no DF. Porém, ressalta-se que a maior parte dos dados (G1 e G2) foram baseados em uma amostragem por conveniência que, apesar de ser uma forma acessível de avaliar animais de companhia e representar a população atendida em clínicas e/ou hospitais, possivelmente introduziu desvios nos resultados. Portanto, não se pode extrapolar os resultados deste estudo para toda população de gatos domésticos do DF.

O estudo da ocorrência da infecção pelo FeLV demonstrou que em G3 não foram identificados gatos FeLV positivos. Contudo, pela distribuição binomial exata, foi possível estimar, com 95% de confiança, que, caso a doença esteja presente na população analisada, ela ocorre, no máximo, em 4,15% dos animais (IC:0-4,15%), o que corrobora Hardy et al., (1976), segundo o qual 0,31% dos gatos com acesso à rua têm FeLV. Essa pode ser uma boa estimativa da real frequência do FeLV no DF, visto que esse grupo (G3) reflete a condição epidemiológica mais próxima do que ocorre na população de gatos do DF e é semelhante aos resultados encontrados em populações similares no Rio de Janeiro (Figueiredo et al., 2009), Flórida (Lee et al., 2002; Luria et al., 2004) e Lisboa (Duarte et al., 2010, Hardy et al., 1976).

Pode-se sugerir, pela baixa prevalência estimada, que gatos com acesso à rua podem não ser um reservatório do FeLV tão significativo quanto já foi determinado (Luria et al., 2004), e que este achado pode refletir uma tendência de diminuição na frequência de infecção pelo FeLV também na região estudada (Gleish et al., 2009a; Herring, 2001). Por outro lado, o restante do DF pode ter frequências virais diferentes da região da Fercal em Sobradinho, devido ao isolamento geográfico dessa área. Dessa forma, a baixa ocorrência na Fercal poderia ser consequência de não haver contato com animais de locais onde as taxas de infecção pelo FeLV podem ser maiores.

No G2, conforme apresentado na tabela 4, a frequência do FeLV foi de 26,8% (IC:19,3-34,2%). Essa ocorrência elevada era esperada, pois pacientes de clínicas e/ou hospitais veterinários tendem a apresentar alguma

doença e/ou sintomatologia, e portanto, as chances de terem FeLV são maiores (Coelho et al., 2008). Este percentual foi semelhante ao encontrado em animais atendidos em clínicas no Rio de Janeiro - 26% de FeLV positivos (Macieira et al., 2008), na Colômbia, 23,3% (Tique et al., 2009) e em Madrid, 30,4-35,7% (Arjona et al., 2000; Arjona et al., 2007).

Entretanto, o G2 apresentou as maiores diferenças em relação a outros estudos no Brasil, como São Paulo, onde observou-se 12% de gatos FeLV positivos (Junqueira-Jorge, 2005), Minas Gerais com 47,5% (Coelho et al., 2011; Coelho et al., 2008), Rio Grande do Sul com 10,8% (Silva et al., 2007) e Rio de Janeiro com 17,4% de animais FeLV positivos (Souza et al., 2002). Em comparação aos estudos realizados em outros países (2,9% de gatos FeLV positivos no Japão (Maruyama et al., 2003), 16,7% na Costa Rica (Blanco et al., 2009), 3,4% no Canadá (Little et al., 2009) e 3,6% na Alemanha (Gleich et al., 2009), o G2 também demonstrou diferença considerável. Essas diferenças ressaltam a variação na ocorrência do vírus de acordo com a região, a condição de saúde dos animais avaliados, o risco na população avaliada de ter ou não alguma retrovirose e o método diagnóstico utilizado (Luria et al., 2004).

É importante destacar que muitos estudos publicados aplicaram ferramentas diagnósticas diferentes da PCR, e, portanto, com sensibilidade e especificidade diversas. A maioria (Teixeira et al., 2007; Blanco et al., 2009; Figueiredo et al., 2009; Macieira et al., 2008; Silva, 2007; Tique et al., 2009; Lee et al., 2002; Arjona et al., 2000; Little et al., 2009; Souza et al., 2002; Gleich et al., 2009; Duarte et al., 2010) utilizou amostras de animais provenientes de clínicas e o teste ELISA comercial (Snap® –CITEcombo FeLV/FIV test kit, IDEXX Systems, Portland, USA), que detecta a proteína p27 do capsídeo, é o mais usado na rotina para diagnosticar o FeLV. Porém, esse teste não é capaz de identificar animais em infecção latente, quando não há transcrição viral, e indica viremia a partir de 28 dias após a infecção. Por sua vez, a PCR é capaz de detectar até 1 cópia do provírus 1 semana após a infecção (Tandon et al., 2005).

Dentre os métodos de pesquisa utilizados, observou-se apenas um estudo no Brasil que também usou animais provenientes de clínicas e a PCR para avaliar a ocorrência do FeLV, realizado na cidade de Belo Horizonte,

MG (Coelho et al., 2011; Coelho et al., 2008) que identificou 47,5% de animais positivos (IC 95%: 47,4 - 47,6%). A diferença significativa em relação a esse estudo pode estar relacionada com circunstâncias socioculturais, que determinam o tipo de vida e a origem dos gatos domésticos, além das possibilidades de interação entre gatos infectados e não infectados. Acredita-se que a população de gatos das cidades comparadas (Belo Horizonte e Brasília) são muito diferentes, sendo a do DF ainda pequena e restrita quando comparada à de Minas Gerais, possivelmente intensa e errante (Marçola, 2011). Apesar de ter utilizado oligonucleotídeos semelhantes, Coelho et al. (2008) realizaram uma n-PCR, cuja sensibilidade é maior do que a PCR feita em nosso estudo. Portanto, é possível que um teste mais sensível tenha identificado mais animais positivos.

De acordo com Hardy et al. (1976) e Levy et al. (2008), gatos que vivem em aglomerados populacionais, como abrigos, têm duas vezes mais chances de ter o FeLV do que gatos que vivem em baixas densidades populacionais. No presente estudo, a amostragem proveniente do abrigo (G1) revelou a maior frequência de positivos (38%, IC:23-53%) e foi semelhante ao encontrado em abrigos de outras localidades brasileiras, como Minas Gerais, onde identificou-se 32,5% de gatos FeLV positivos (Teixeira et al., 2007) e Rio Grande do Sul, cuja frequência foi de 38,3% (Meinerz et al., 2009). No entanto, não houve diferença em relação aos animais atendidos em clínicas (G2) como é observado pelo intervalo de confiança e valor p presentes nas tabelas 4 e 5.

A frequência em G1 é corroborada por Fenner (2011) e Hartmann (2006), que relatam uma prevalência de até 30% em animais constantemente expostos ao vírus. Isso porque o risco de infecção aumenta, também em gatos adultos, quando os animais convivem com gatos virêmicos, o que é facilmente observado em gatis onde o FeLV é endêmico ou em casas em que os animais se tornam positivos após anos de convívio com gatos infectados (Grant et al., 1980).

Em contraposição exposto por Arjona et al. (2000), não se observou diferença na prevalência do FeLV em relação à idade e sexo (tabela 3), o mesmo achado que Gomes-Keller et al. (2006) (exceto para a idade). Contudo, o resultado para idade pode ter sido influenciado pela falta de

dados para alguns animais. Observou-se diferença significativa ($p=0,0003$) na frequência do FeLV quanto ao acesso à rua. Contudo, a significância encontrada foi de que animais que têm acesso à rua têm menor frequência do FeLV, o que não possui qualquer embasamento biológico (tabela 4). Porém, essa diferença ocorreu devido ao desvio causado pelo grupo G3, onde todos os animais foram FeLV negativos e tinham acesso à rua. Ao retirar-se esse grupo, observou-se que não havia diferença de frequência do FeLV em relação a esse fator, $p=0,549$. Acredita-se que essa observação também foi influenciada pela limitação de dados.

Em geral, as principais retrovíroses felinas, FeLV e FIV, são tratadas em conjunto, pois a associação entre elas é reconhecida (Pedersen et al., 1990). Contudo, nos animais do presente estudo, constatou-se que a proporção de gatos FIV positivos não é maior dentre os gatos com FeLV ($p=0,06$) (tabela 6). Diferente dos achados de Gleich et al. (2009), que observaram que a infecção por FeLV aumentou o risco de infecção pelo FIV, e de Luria et al. (2004), que encontraram associação do FeLV com FIV, além de hemoplasmas.

Nos Estados Unidos, Lee et al. (2002) testaram 1876 gatos de rua e não encontraram associação entre a infecção por FeLV e FIV. Os autores descrevem a existência de trabalhos com resultados conflitantes sobre o assunto e questionam se essa suposta associação realmente se deve à imunossupressão induzida por um vírus, que facilita a instalação do segundo, ou se é devido apenas a animais expostos aos mesmos fatores de risco e com o mesmo estilo de vida. Certamente, esta é uma questão que precisa ser respondida por meio de um estudo com controle dos fatores de risco capaz de verificar se há ou não um mecanismo específico por meio do qual essa associação ocorra.

A frequência de animais com infecção concomitante por FeLV e FIV encontrada em nosso estudo foi de 1,49% na população total e 7,5% no grupo FeLV positivo (tabela 8). Não foi diferente das frequências encontradas por Silva (2007) (6,1%), Tique et al. (2009) (5%), Lee et al. (2002) (7,4%), Arjona et al. (2000) (2,6%), Little et al. (2009) (0,5%), Duarte et al. (2010) (1,6%), Ravi et al. (2010) (0,7%) e Luria et al. (2004) (0,5%). Mas diferiu significativamente de Gleich et al. (2009) (0,2%) e Akhtardanesh et al. (2010)

(0,03%) de acordo com a comparação do intervalo de confiança. São frequências normalmente baixas, pois estudos soroepidemiológicos indicam que esses gatos (FeLV/FIV) vivem por menos tempo e apresentam doença mais severa (Pedersen et al., 1990). No estudo de Pedersen et al. (1990), 50% dos gatos FeLV/FIV morreram em menos de um ano após a infecção. A morte rápida nesses casos pode reduzir o número de animais com essa coinfeção, mas a população em risco para cada uma dessas viroses difere. As taxas de infecção do FIV aumentam diretamente com a idade, enquanto infecção persistente pelo FeLV tem maior incidência em gatos jovens (Neil, 2008).

Não se verificou uma tendência de gatos infectados pelo FeLV apresentarem coinfeção por hemoplasmas, pois não houve diferença na proporção de gatos com infecção por hemoplasmas entre os grupos FeLV positivos e negativos (tabela 6). O mesmo resultado encontrado por Macieira et al. (2008), Roura et al. (2010), Maher et al. (2010), Gentilini et al. (2009) e Willi et al. (2006). Bauer et al. (2008) encontrou associação de retrovírus apenas com '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*', sendo que a prevalência deste hemoplasma é maior do que do *Mycoplasma haemofelis* (Gentilini et al., 2009). Não se realizou a classificação dos hemoplasmas identificados no presente estudo, mas, a maior frequência de *Mycoplasma haemofelis* poderia justificar a ausência de associação com o FeLV. Além disso, acredita-se que diferenças na relação parasita/hospedeiro secundárias a variações sazonais/regionais ou o estágio da infecção podem ter contribuído para o achado de não associação (Macieira et al., 2008).

Na pesquisa de Luria et al. (2004), que amostraram 553 gatos de rua, observou-se associação entre retrovírus e hemoplasmas. Os autores sugerem que esta associação pode ser devido à imunossupressão induzida pelas retrovírus, que contribuiu para a instalação da infecção pelo hemoplasma, ou de que os fatores de risco para as retrovírus são os mesmos para as hemoplasmoses.

Da mesma forma que Macieira et al. (2008), foi observada maior proporção (75%) de animais positivos para hemoplasma entre animais com dupla infecção por FeLV/FIV.

Não há relatos da associação do FeLV com a presença do *T. gondii*, nem foram encontrados animais positivos para este protozoário em nosso estudo (tabelas 4, 5, 6, 8). Acredita-se que a ferramenta diagnóstica utilizada, PCR, tenha sido a razão deste achado. É possível que, por meio da sorologia, fossem encontrados mais animais reagente ao *T. gondii* e a partir daí avaliar se há associação entre o FeLV e a exposição ao *T. gondii* (Akhtardanesh et al., 2010). Dentre as poucas publicações que tratam dessa coinfeção (Akhtardanesh et al., 2010, Luria et al., 2004, Maruyama et al., 2003), nenhuma delas encontrou associação entre a sorologia para *T. gondii* e alguma retrovirose. Porém, de acordo com Akhtardanesh et al. (2010), o FeLV auxilia na disseminação e potencializa a imunossupressão causada pelo FIV, dessa forma, o FeLV poderia afetar indiretamente a suscetibilidade dos gatos ao *T. gondii*. Esse fato é corroborado pelo fato de terem sido isolados apenas quatro animais FeLV e FIV positivos concomitantemente, logo, com este pequeno número de gatos com ambas retroviroses dificilmente se encontraria associação com o *T. gondii*.

A identificação dos subtipos pela n-PCR revelou 39,6% do subtipo A e 54,7% FeLV-AB (tabela 11). O subtipo C ou a combinação ABC não foram encontrados. Este achado está em concordância com o estudo prévio de Coelho et al. (2008) e corrobora a conclusão de Tandon et al. (2005), de que o FeLV-A está presente em todos os gatos infectados, o FeLV-B ocorre em 50% das infecções e o FeLV-C ocorre em 1% dos casos.

Hardy et al. (1976) encontraram maior percentual de FeLV-A do que de FeLV-AB e sugerem que a presença do subtipo sofre influência do ambiente. Em grupos fechados, onde os animais não têm contatos externos, o subtipo tende a ser o mesmo e único em todo o grupo de animais. Já em populações nas quais o vírus foi introduzido por transmissão vertical externa, espera-se uma distribuição equilibrada de FeLV-A e FeLV-AB, como ocorre no ambiente natural. Em populações nas quais os animais têm acesso externo, espera-se encontrar gatos com diferentes subtipos. Dessa forma, acredita-se que a distribuição de subtipos do nosso estudo segue um padrão equilibrado, como ocorre na transmissão vertical natural, uma vez que não se observou diferença nas proporções dos subtipos dentro de cada grupo avaliado.

Embora seja frequentemente citado que o FeLV-B ocorre apenas na presença do FeLV-A (Fenner, 2011; Neil, 2008; Hartmann, 2006; Hartmann, 2011), nosso estudo identificou uma amostra cujo o único subtipo encontrado foi o FeLV-B (tabela 11). Este achado reforça a evidência de que em alguns animais o enFeLV pode estar mais associado com infecção ativa do que já foi determinado (Stewart et al., 2011). Stewart et al. (2011) isolaram amostras que apresentaram apenas o FeLV-B, sem evidência do FeLV-A. Os autores sugerem que o vírus recombinante adquiriu maior quantidade de elementos promotores e potencializadores da porção U3 de origem exógena e, por isso, atingiu maiores taxas de transcrição ao ponto de se sobrepor ao crescimento do vírus exógeno que deu origem a ele. Na mesma pesquisa (Stewart et al., 2011), um dos isolados apresentou sequências incompletas do FeLV-A, o que levantou a hipótese de que é possível que mutações em sequências do FeLV-A impossibilitem o anelamento adequado dos oligonucleotídeos da PCR (Hofmann-Lehmann et al., 2001), pois é reconhecida a atividade falha da transcriptase reversa, que não possui mecanismos de correção de erros, o que provoca mutações sutis que se acumulam na porção SU do gene *env* durante a infecção, o que pode alterar as propriedades biológicas do vírus (Murphy et al., 1999). Esses achados nos levaram a crer que a presença de sequências incompletas (Stewart et al., 2011) ou alteradas (Hofmann-Lehmann et al., 2001) do FeLV-A tenham ocorrido nos dois casos de animais FeLV positivos nos quais não foram identificados nenhum subtipo testado.

Considerou-se também a possibilidade desses animais apresentarem o subtipo FeLV-T, logo, não seriam identificados uma vez que não foram utilizados oligonucleotídeos específicos para esse subtipo. Dessa forma, avaliou-se os resultados hematológicos a fim de verificar indícios de imunossupressão, o que poderia corroborar a presença do FeLV-T. Porém, em apenas um desses animais foi realizado hemograma completo e que pode ter comprometido uma melhor análise. O animal apresentou linfopenia, trombocitopenia e hiperproteinemia, segundo as referências de Jain, 1993. A linfopenia foi descrita na infecção por FeLV-T (Hartmann, 2006; Hartmann, 2011; Linenberger, 1998), porém trombocitopenia e hiperproteinemia, não foram associadas a esse subtipo. Porém, é preciso determinar a sequência das regiões variáveis do gene *env* por meio de amplificação com os

oligonucleotídeos específicos, além de testes de interferência e neutralização para confirmar o subtipo envolvido (Hofmann-Lehmann, 2001).

Muitos estudos demonstram a utilidade da PCR no diagnóstico do FeLV (Tandon et al., 2005; Gomes-Keller et al., 2006; Arjona et al., 2007; Herring et al., 2001). De fato, a aplicabilidade desta ferramenta molecular é promissora, pois, no caso da infecção pelo FeLV, a evidência direta da presença do vírus é mais realista e confiável do que os dados indiretos fornecidos pelos métodos sorológicos.

A concordância entre a PCR aplicada neste estudo e o teste comercial ELISA (Snap® –CITEcombo FeLV/FIV test kit, IDEXX Systems, Portland, USA), amplamente utilizado na rotina clínica da região avaliada, foi de 91,3% ($k=0,8085$), semelhante aos achados de Arjona et al., 2007 e Herring et al., 2001. De acordo com Donhoo et al. 2003, este valor kappa revela concordância quase perfeita entre os testes (tabela 14). Esse resultado é justificável pelo comportamento biológico do vírus no hospedeiro, desse modo, não se esperava concordância de 100%, pois, apesar de ambos os testes serem capazes de identificar a infecção, eles distinguem-se na capacidade de detectar o vírus em situações particulares (a PCR na infecção latente, o ELISA na infecção localizada). De acordo com Tandon et al. (2005), o ELISA tem correlação mais forte com o RNA plasmático do que com o provírus, provavelmente porque os dois primeiros detectam a mesma atividade biológica do vírus (replicação). Diferente dos nossos resultados, Torres et al. (2005) encontrou baixa correlação entre PCR e ELISA, $k=0,53$.

Em relação aos resultados discordantes entre PCR e ELISA (tabela 14), é preciso considerar que esta PCR foi desenhada e testada para amplificar três subtipos do FeLV (A, B e C) e não identificar sequências endógenas semelhantes ao FeLV (Tandon et al., 2005). Isso porque nem todos os animais naturalmente infectados podem ser detectados por PCRs baseadas apenas na sequência do gene *env* do FeLV-A (Hofmann-Lehmann et al., 2001). Além disso o controle de amplificação (PCR para GAPDH) confirma a ausência de falsos negativos devido à degeneração no DNA ou inibidores da PCR. As amostras com resultados discordantes entre a PCR e o ELISA foram repetidas e os resultados confirmados e a contaminação é

pouco provável, porque as reações repetidas produziram resultados idênticos e controles positivos e negativos foram sempre incluídos.

Obteve-se 10% de animais ELISA+/PCR-, aproximadamente metade da porcentagem encontrada por Arjona et al. (2007) e dez vezes mais que o achado por Torres et al. (2005), que não encontrou animais nessa condição. Considerou-se as seguintes possibilidades para este resultado: animais em estágios iniciais da infecção, nos quais há viremia inicial, mas ainda não ocorreu a inserção do provirus no genoma - apesar de que, segundo Tandon et al. (2005), a PCR é mais sensível do que o ELISA nas fases iniciais da infecção -, infecções localizadas fora da medula óssea, nas quais apenas os antígenos virais estão presentes na circulação, ou resultados falso positivo no ELISA, que podem ocorrer em casos de sangue hemolisado (Arjona et al., 2007; Herring et al., 2001). Não foi possível o acesso a amostras de outros tecidos para verificar a presença de infecção localizada. De acordo com Flynn et al. (2002), há a possibilidade de persistência de proteínas p27 circulantes apesar da ausência de vírus circulante.

Foram identificados 2,8% de gatos ELISA-/PCR+, semelhante ao achado de Torres et al. (2005) e Gomes-Keller et al. (2006), mas significativamente diferente dos resultados de Hofmann-Lehmann et al. (2001) (10%), Miyazawa et al. (1997) (nenhum animal) e Arjona et al. (2007) (25%). Sugere-se que estes animais, de fato, estavam infectados pelo FeLV, mas foram imunologicamente capazes de superar a antigenemia na fase inicial da instalação viral - infecção regressiva-, contudo, permaneceram com o provirus integrado em células precursoras (Tandon et al., 2005). A importância clínica desses animais - p27 negativos e provirus positivos - ainda não foi esclarecida (Hofmann-Lehmann et al., 2001).

Considerando a alta especificidade (98,2%) e sensibilidade (98,6%) do ELISA confirmadas pelo fabricante (INDEXX® Laboratories), não se pode afirmar que todos os casos discordantes do ELISA foram por falsos negativos e/ou falsos positivos. Esses podem ter sido achados de infecções latentes ou com concentrações de p27 abaixo do detectável pelo ELISA, além de erros técnicos (Arjona et al., 2007).

As diferenças observadas entre os estudos ressaltam as possíveis influências da idade dos animais, momento da infecção e variações regionais de cepas (Hartmann, 2011).

A PCR realizada em nosso estudo foi baseada no FeLV-61E-A, uma cepa reconhecida por sua alta capacidade de infectar e replicar sem causar doença aguda (Hofmann-Lehmann et al., 2001; Torres et al., 2005). A região amplificada (U3 LTR) é altamente conservada entre os diversos subtipos, dessa forma, acredita-se que mesmo que o vírus tenha sofrido combinações ele ainda pode ser identificado pelos oligonucleotídeos utilizados neste estudo (Torres et al., 2005).

É importante considerar que cada teste é adequado em um momento da infecção, e que o diagnóstico definitivo do FeLV não deve ser amparado apenas pelo resultado de um teste diagnóstico. É preciso levar em consideração a sintomatologia apresentada e os fatores de risco aos quais o gato foi exposto. Segundo Tandon et al. (2005), para a detecção acurada da exposição ao FeLV e caracterização da condição do gato, seria necessária a combinação de pelo menos dois testes: PCR e qPCR, PCR e ELISA.

Observou-se que os animais FeLV positivos têm aproximadamente quatro vezes mais chances de serem anêmicos (seja por redução no hematócrito, hemácias ou hemoglobina) do que gatos FeLV negativos (tabela 17). Um achado que já foi relatado anteriormente (Arjona et al., 2000; Gleich et al., 2009; Akhtardanesh et al., 2010) e que é justificável pelo reconhecido efeito do FeLV nas células precursoras hematopoiéticas (Hartmann, 2011; Hofmann-Lehmann et al., 1997). Os mecanismos responsáveis pelas alterações hematológicas na infecção aguda parecem ter forte relação com a cepa viral e sofrem influência da idade do hospedeiro, sua capacidade de resposta imunológica e da carga viral (Linenberger et al., 1998). Porém, a forma como o FeLV causa anemia ainda não foi definida (Hartmann, 2006). Há especulações sobre um efeito supressivo direto na medula óssea (Hartmann, 2006), casos de hemólise devido à hemoplasma, secundárias a infecções crônicas pelo sequestro de ferro (Hartmann, 2006; Gleich et al., 2009), metástase em medula óssea, desordens mielodisplásicas ou deficiências nutricionais (Gleich et al., 2009). Contudo, as mesmas alterações

não foram relatadas nas pesquisas de Macieira et al. (2008) e Hofmann-Lehmann et al. (1997).

Assim como Hofmann-Lehmann et al. (1997), mas diferente de Arjona et al. (2000) e Gleich et al. (2009), nosso estudo não encontrou associação entre gatos FeLV positivos e macrocitose, leucopenia, neutropenia, linfopenia e/ou trombocitopenia (tabela 17), apesar de ser reconhecida a capacidade do vírus de causar redução no número de leucócitos, além de trombocitopenia (Hartmann, 2011) e macrocitose (Weiser et al., 1983). Os mecanismos exatos que causam as diferentes respostas clínicas são pouco compreendidos, porém, acredita-se que as diferenças encontradas neste estudo em relação a outros semelhantes tenham relação com fatores virais e do hospedeiro. A cepa viral pode variar consideravelmente entre as regiões e o subtipo determina as diferenças no curso clínico (Hartmann, 2011).

Grant et al. (1980) observaram associação entre uma diminuição súbita no número de leucócitos e o início da viremia. Contudo essa leucopenia durou aproximadamente 6 semanas nos gatos que eliminaram a infecção, e 3 meses naqueles que permaneceram virêmicos. Esses achados demonstram que a alteração nos leucócitos tem relação não só com o momento da infecção, mas também com a capacidade do animal de eliminá-la ou não. Dessa forma, pode-se considerar que muitos animais do nosso estudo poderiam estar em um processo de eliminação da infecção e, por isso, manifestaram pouca ou nenhuma alteração nos leucócitos.

É importante considerar que apesar de não se ter encontrado leucopenia de nenhum tipo neste estudo, gatos FeLV podem ser mais suscetíveis à coinfeções e infecções secundárias por disfunções do sistema imune. Muitas funções imunológicas estão alteradas em gatos FeLV positivos, como depressão na função de neutrófilos, redução na produção de imunoglobulinas, depleção do sistema complemento e na produção de IL-2 e IL-4. Além disso, gatos FeLV positivos não respondem adequadamente à vacinação (Hartmann, 2011). Sugere-se que muitos animais FeLV positivos do grupo G2 foram levados a clínicas ou hospitais veterinários por alterações secundárias a essas disfunções imunológicas induzidas pelo FeLV.

É preciso ressaltar que a idade média dos animais amostrados no presente estudo foi de 6 anos, uma faixa etária pouco associada com os

efeitos mais severos do FeLV. De acordo com Flynn et al. (2002), a resistência aos efeitos do vírus está diretamente relacionada com a presença de linfócitos T citotóxicos que surgem antes da resposta humoral. Infecções progressivas com viremia persistente estão associadas com silenciamento da resposta celular e humoral específica ao vírus. Dessa forma, o fator associado ao hospedeiro que mais interfere no resultado da infecção é a idade em que o animal é infectado. Enquanto gatos jovens e filhotes tendem a sucumbir aos efeitos deletérios do vírus, gatos adultos parecem desenvolver uma resistência progressiva, e quando infectados, tendem a eliminar ou suprimir a infecção, e, caso a desenvolvam, apresentam sinais leves e um período assintomático mais longo (Hartmann, 2011; Grant et al., 1980). Não foi possível avaliar as alterações hematológicas apenas dentre os animais mais velhos devido à falta de dados sobre a idade de todos os animais.

Os resultados do presente estudo sugerem que a maioria dos animais infectados pelo FeLV avaliados não apresentaram sinais clínicopatológicos clássicos e que esse achado pode ter relação direta com a faixa etária dos gatos amostrados.

Apesar das diferenças encontradas entre os gatos FeLV positivos e os negativos, a maioria dos animais do estudo permaneceu dentro dos valores de referência (tabelas 16 e 17). As diferenças foram identificadas pela comparação entre animais que estavam na mesma categoria (abaixo, dentro ou acima do parâmetro hematológico). O que reforça a importância de se confrontar adequadamente as variáveis de acordo com as suas características.

Neste estudo não foi realizada a contagem de reticulócitos, devido ao seu caráter parcialmente retrospectivo, o que não permitiu a avaliação da resposta medular. Apesar disso, os resultados encontrados são compatíveis com outros estudos (Hartmann, 2011; Arjona et al., 2000; Gleich et al., 2009; Akhtardanesh et al., 2010; Hofmann-Lehmann et al., 1997), em que os gatos FeLV positivos apresentaram significativamente mais anemia quando comparados aos FeLV negativos. Porém, mesmo que a contagem de reticulócitos fosse realizada, dificilmente se encontraria regeneração nos gatos FeLV positivos anêmicos, pois a anemia regenerativa é pouco comum

na infecção por FeLV e, quando ocorre, pode estar relacionada à perda de sangue ou à hemólise secundária a infecção por hemoplasma ou doença imunomediada (Gleich et al., 2009).

Sugere-se que a anemia observada neste estudo seja consequência da infecção pelo FeLV, uma vez que os gatos negativos não apresentaram alteração em nenhum parâmetro hematológico. Porém, deve-se considerar que outros fatores podem ter contribuído para a presença de anemia nos animais com FeLV, tais como infecções secundárias e/ou doenças crônicas (Weiss, 2006).

Nenhum dos animais avaliados demonstrou sinais clinicopatológicos de doença hematológica neoplásica associada ao FeLV. Acredita-se que aqueles com contagem leucocitária elevada (>50.000 leucócitos/ μL) sejam casos de respostas inflamatórias leucemoides secundárias às infecções oportunistas (Riegel et al., 2000), uma vez que observou-se esse parâmetro nos animais do G1, que viviam em alta densidade populacional, logo, com difícil manutenção de condições de higiene adequadas, e em G2, grupo com maior probabilidade de ter outras doenças.

De acordo com Linenberger et al. (1998), cerca de 50% dos gatos com doenças não neoplásicas relacionadas ao FeLV e 2/3 dos gatos com linfoma por FeLV têm anemia arregenerativa, e, geralmente, macrocítica. Apesar disso, no nosso estudo, não foi possível associar a presença do FeLV com aumento no VCM (tabela 17). Todavia, sabe-se que o cálculo manual do VCM e o CHCM é pouco sensível para detectar alterações no volume e na concentração de hemoglobina nos eritrócitos quando o número de eritrócitos anormais é pequeno e, nestes casos, os valores de VCM e CHCM tendem a ficar dentro dos valores de referência (Riegel et al., 2000).

A capacidade do FIV de causar imunossupressão e hiperproteinemia é reconhecida (Gleich et al., 2009; Akhtardanesh et al., 2010; Riegel et al., 2000) e muitos autores relatam que a coinfeção do FIV com o FeLV causa consequências mais severas do que cada retrovirus isoladamente (Hofmann-Lehmann et al., 1997; Pedersen et al., 1990). Contudo, neste estudo não se observaram alterações significativas nos parâmetros hematológicos dos gatos FeLV/FIV em relação ao grupo FeLV positivo ou em relação ao grupo FeLV negativo (tabela 19), semelhante ao resultado de Hofmann-Lehmann et

al. (1997). Porém, Pedersen et al. (1990) encontraram mais animais leucopenicos no grupo FeLV/FIV. Este achado pode ter relação com o pequeno número de gatos FeLV/FIV (n=4). É possível que a avaliação de um número maior de animais nesta categoria gere diferenças significativas. Entretanto, animais naturalmente infectados por ambas retrovírus normalmente ocorrem em frequências baixas - entre 0,03% a 7,4% (Lee et al., 2002; Luria et al., 2004) -, já que o índice de mortalidade neste grupo é de aproximadamente 50% (Pedersen et al., 1990). Há possibilidade de influência das cepas virais envolvidas e do momento da infecção de cada infecção.

A principal diferença encontrada foi o aumento significativo da média das proteínas no grupo FeLV/FIV em relação ao grupo controle. Sugere-se que este achado tenha relação com a infecção pelo FIV, uma vez que a hipergamaglobulinemia é associada a este vírus e não é um achado comum em gatos com FeLV (Hofmann-Lehmann et al., 1997). Embora as infecções oportunistas sejam comuns e causem estímulo antigênico constante, a resposta humoral em gatos com FeLV é reduzida, principalmente devido à redução progressiva na atividade de células T-helper, por isso a hipergamaglobulinemia é um achado raro em gatos FeLV positivos (Gleich et al., 2009).

Não se observou diferença nos parâmetros hematológicos entre gatos FeLV/ hemoplasmas e gatos FeLV (tabela 18). Há relatos em que não houve associação dos hemoplasmas com anemia (Macieira et al., 2008; Bauer et al., 2008; Gentilini et al., 2009; Willi et al., 2006), e como foi observado anteriormente, nem todos os gatos FeLV positivos manifestam anemia.

Suspeita-se que o '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*' tenha representado a maioria dos casos de haemoplasmose encontrados, pois em geral essa é a espécie mais frequente e também menos patogênica do que o *M. haemofelis* (Gentilini et al., 2009). Não se realizou a identificação das espécies dos hemoplasmas identificados neste estudo, mas, a presença de mais animais com '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*' poderia justificar a ausência de associação com anemia. Além disso, o estágio da infecção pelo hemoplasma também pode ter influenciado neste resultado, uma vez que gatos não eliminam completamente o hemoplasma. Os gatos FeLV/hemoplasma deste estudo podem ter manifestado anemia no início da

infecção, mas após a recuperação essa alteração não foi mais observada (Macieira et al., 2008; Bauer et al., 2008; Willi et al., 2006). Segundo Macieira et al. (2008), as diferenças na relação parasita/hospedeiro secundárias a variações sazonais/regionais ou o estágio da infecção podem ter contribuído para a não associação do hemoplasma com anemia.

De acordo com Willi et al. (2006), apenas a presença do retrovírus é insuficiente para facilitar a infecção por hemoplasmas, é necessário que haja imunossupressão ou interação com as células precursoras hematopoiéticas para que ocorra manifestação de anemia por hemoplasma.

Não foram encontradas pesquisas descrevendo as alterações hematológicas presentes em gatos com as três infecções concomitantes. Nosso estudo identificou apenas três animais nesta situação, que não geraram diferenças significativas nos parâmetros hematológicos em relação aos gatos FeLV positivos apenas, contudo esse achado pode ser resultado do pequeno número de animais encontrados ou pode indicar que a presença do FIV e de hemoplasmas concomitante ao FeLV não induz alterações hematológicas significativas.

A avaliação hematológica foi realizada em apenas dois destes animais: um não manifestou qualquer alteração e o outro apresentou anemia por redução no VG, número de hemácias e concentração de hemoglobina, aumento no VCM e nas proteínas plasmáticas totais e redução no número de leucócitos, linfócitos e plaquetas. Este segundo animal apresentou as alterações clássicas de cada infecção, FeLV e hemoplasma (Skyles, 2010; Tasker 2010; Riegel et al., 2000), contudo, não se sabe qual agente surgiu primeiro, ou em qual fase de cada infecção este gato estava, portanto é impossível definir qual patógeno foi responsável por cada alteração observada.

Sabe-se que os determinantes da patogenicidade do FeLV localizam-se no LTR e principalmente nas glicoproteínas de superfície (SU). Pequenas mudanças no SU podem modificar dramaticamente o receptor usado e as doenças causadas (Neil, 2008). Contudo, os resultados observados neste estudo não demonstraram diferenças nos parâmetros hematológicos entre os gatos FeLV-A e FeLV-AB (os únicos identificados) (tabela 20). Este achado é corroborado pelos resultados de Hardy et al. (1976), que identificaram o

FeLV-B em 30-50% das infecções naturais e sempre associado ao FeLV-A. Acredita-se que essa diferença não foi observada porque ambos subtipos infectam as mesmas células (Dean et al., 1992) e possivelmente produzem o mesmo efeito nas células precursoras hematopoiéticas, e, portanto, induzem anemia da mesma forma (com exceção do FeLV-C, que será visto à diante). Fato diferente foi descrito com outros tipos de células, onde observou-se uma maior ocorrência de tumores na infecção pelo FeLV-B em relação ao FeLV-A (Hardy et al., 1976; Ahmad et al., 2010).

Sabe-se que o FeLV-A é um subtipo pouco patogênico (Hardy et al., 1976), e, dessa forma, pode ocasionar uma leve anemia, como a que foi observada no presente estudo, e que ainda pode ter relação com os efeitos secundários da infecção, como anemia por doença crônica ou por infecções secundárias. No entanto, até o momento, não foram encontrados estudos relacionando as infecções por FeLV-A ou AB com as alterações hematológicas.

Esperava-se encontrar gatos FeLV-C dentre aqueles 10 animais FeLV positivos com anemia severa (VG<10-13%, de acordo com Riegel et al., 2000). Contudo, da mesma forma que Coelho et al. (2008), não foram identificados gatos com este subtipo (tabela 12). Considerou-se que essa anemia poderia ter sido induzida por haemoplasmose, porém apenas 3 destes animais foram positivos na PCR para hemoplasmas.

De acordo com Weiss (2006), a contribuição do FeLV na prevalência de anemia aplásica é baixa, o FeLV-C ocorre em apenas 1% dos casos de FeLV (Linenberger et al., 1998). O mesmo autor relata que diversas doenças estão associadas com anemia aplásica, como a insuficiência renal crônica. Outras causas de anemia (além da hemoplasmaose) não foram avaliadas em nosso estudo estudo, dessa forma, não é possível afirmar se outras doenças contribuíram para o baixo hematócrito nestes animais.

No experimento de Dean et al. (1992), todos os animais inoculados com FeLV-A mantiveram hematócrito normal. Aqueles inoculados com FeLV-C desenvolveram anemia severa arregenerativa. O estudo demonstrou que as proteínas do gp70 tanto do FeLV-A quanto do FeLV-C estavam igualmente expressas em linhagens celulares eritroides e linfoides, e mesmo assim, apenas o FeLV-C causou anemia severa.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos durante a pesquisa permitiram concluir nos animais dos grupos avaliados que:

- a frequência do FeLV é alta nos gatos mantidos no abrigo e naqueles atendidos em clínicas veterinárias e nula ou baixa nos animais da região periurbana;

- dois subtipos do FeLV acometem os animais avaliados: FeLV-A e FeLV-AB;

- a PCR para identificar o provirus do FeLV apresenta forte concordância com os resultados do ELISA comercial;

- o FeLV está associado com anemia normocítica normocrômica;

- gatos com FeLV não apresentam mais infecção por FIV, hemoplasmas ou *T. gondii* em comparação aos gatos não infectados por FeLV;

- a coinfeção do FeLV com FIV ou hemoplasmas não causa alterações hematológicas significativas.

REFERÊNCIAS

- AHMAD, S., LEVY, L. S. The frequency of occurrence and nature of recombinant feline leukemia viruses in the induction of multicentric lymphoma by infection of domestic cat. **Virology**, v. 403, p. 103-110, 2010.
- AKHTARDANESH, B., ZIAALI, N., SHARIFI, H., REZAEI, S. Feline immunodeficiency virus, feline leukemia virus and *Toxoplasma gondii* in stray and household cats in Kerman-Iran: Seroprevalence and correlation with clinical and laboratory findings. **Research in Veterinary Science**, v. 89, p. 306-310, 2010.
- ARJONA, A., ESCOLAR, E., SOTO, I., BARQUERO, N., MARTIN, D., GOMES-LUCIA, E. Seroepidemiological survey of infection by feline leukemia virus and immunodeficiency virus in Madrid and correlation with some clinical aspects. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 3448-3449, 2000.
- ARJONA, A., BARQUERO, N., DOME'NECH, 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.
- BAUER, N., BALZER, H., THURE, S., MORITZ, A. Prevalence of feline haemotropic mycoplasmas in convenience samples of cats in Germany. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 10, p. 252-258, 2008.
- BIRKENHEUER A.J., LEVY M.G., BREITSCHWERDT E.B. Development and Evaluation of a Seminested PCR for Detection and Differentiation of *Babesia gibsoni* (Asian Genotype) and *B. canis* DNA in Canine Blood Samples. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, p. 4172–4177, 2003.
- BLANCO, K., PRENDAS, J., CORTES, R., JIMENEZ, C., DOLZ, G. Seroprevalence of viral infectious in domestic cats in Costa Rica. **J Vet Med Sci**, v. 71, p. 661-663, 2009.

- BOLIN, L. L., LEVY, L. S. Viral determinants of FeLV infections and pathogenesis: lessons learned from analysis of a natural cohort. **Viruses**, v. 3, p. 1681-1681, 2011.
- BROWN, M. A., CUNNINGHAM, M. W., ROCA, A. L., TRYLER, J. L., JOHNSON, W. E., O'BRIEN, S. J. Feline leukemia virus from Florida panthers. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, p. 252-259, 2008.
- BURG, L., GROVER, C. M., POULETTY, P., BOOTHROYD, J. C. Direct and sensitive detection of a pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii*, by polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 27, p. 1787-1792, 1989.
- CHEN, H., BECHTEL, M. K., SHI, Y., PHIPPS, A., MATHES, L. E., HAYES, K. A., ROY-BURMAN, P. Pathogenic induced by feline leukemia virus, Rickard strain, subgroup A plasmid DNA (pFRA). **Journal of Virology**, v. 72, p. 7048-7056, 1998.
- 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 cattus* em Belo Horizonte. **Arq Bras Med Vet Zootec**, v. 63, p. 778-783, 2011
- COELHO, F. M., BOMFIM, M. R. Q., CAXITO, F. A., RIBEIRO, N. A., LUPPI, M. M., COSTA, E. A., OLIVEIRA, M. E., FONSECA, F. G., RESENDE, M. Naturally occurring feline leukemia virus subgroup A and B infections in urban domestic cats. **Journal of General Virology**, v. 89, p. 2799-2805, 2008.
- DEAN, G. A., GROSHEK, P. M., MULLINS, J. I., HOOVER, E. A. Hematopoietic target cells of anemogenic subgroup C versus nonanemogenic subgroup A feline leukemia virus. **Journal of Virology**, v. 66, p. 5561-5568, 1992.
- DOHOO, I., MARTIN, W., STRYHN, H. **Veterinary Epidemiologic Research**. ACV Inc., University of Prince Edward Island, 550 University Avenue, Charlottetown, Prince Edward Island, Canada. 2003. 727 p.
- CRIADO-FORNELIO, A., MARTINEZ-MARCOS, A., BULING-SARAÑA, A., BARBA-CARRETERO, J. C. Presence of *Mycoplasma haemofelis*, *Mycoplasma haemominutum* and piroplasmids in cats from southern

- Europe: a molecular study. **Veterinary Microbiology**, v93, p. 307-317, 2003.
- 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.
- Fenner's Veterinary Virology**. 4. ed. London: Academic Press, 2011. 491p.
- FIGUEIREDO, F. B., BONNA, I. C. F., NASCIMENTO, L. D., COSTA, T., BAPTISTA, C., PACHECO, T. M. V., AMENDOEIRA, M. R. R., MADEIRA, M. F. Serological evaluation for detection of anti-Leishmania antibodies in dogs and cats in the district of Santa Rita de Cássia, municipality of Barra Mansa, state of Rio de Janeiro. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.42, p. 141-145, 2009.
- FLYNN, J. N., DUNHAM, S. P., WATSON, V., JARRET, O. Longitudinal analysis of feline leukemia virus-specific cytotoxic T lymphocytes: correlation with recovery from infection. **Journal of Virology**, v. 76, p. 2306-2315, 2002.
- GENTILINI, F., NOVACCO, M., TURBA, M. E., WILLI, B., BACCI, M. L., HOFMANN-LEHMANN, R. Use of combined conventional and real-time PCR to determine the epidemiology of feline haemoplasma infections in northern Italy. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 11, p. 277-285, 2009.
- GLEICH, S. E., KRIEGER, S., HARTMANN, K. Prevalence of feline immunodeficiency virus and feline leukaemia virus among client-owned cats and risk factors for infection in Germany. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 11, p. 985-992, 2009a.
- GLEICH, S., HARTMANN, K. Hematology and serum biochemistry of feline immunodeficiency virus-infected and feline leukemia virus-infected cats. **J Vet Intern Med**, v23, p. 552-558, 2009b.
- GOMES-KELLER, M. A., GONCZI, E., TANDON, R., RIONDATO, F., HOFMANN-LEHMANN, R., MELI, M. L., LUTZ, H. 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**, v. 44, p. 916-922, 2006.
- GRANT, C. K., ESSEX, M., GARDNER, M. B., HARDY, W.D. Natural feline leukemia virus infection and the immune response of cats of different ages. **Cancer Research**, v.40, p. 823-829, 1980.
- HARDY, W. D., HESS, P. W., MACEWEN, E. G., McCLELLAND, A. J., ZUCKERMAN, E. E., ESSEX, M., COTTER, S. M., JARRET, O. Biology of feline leukemia virus in the natural environment. **Cancer Research**, v. 36, p. 582-588, 1976.
- HARTMANN, K. Feline leukemia virus infection. In: GREENE, C. E. **Infectious Diseases of the Dog and Cat**, ed 3, St Louis, 2006, Saunders Elsevier, p 107.
- HARTMANN, K. Clinical aspects of feline immunodeficiency and feline leukemia virus infection. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.143, p. 190-201, 2011.
- HERRING, E. S., TROY, G. C., TOTH, T. E., FORRESTER, S. D., WEIGT, L. A., HERRING, I. P. Detection of feline leukaemia virus in blood and bone marrow of cats with varying suspicion of latent infection. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 3, p. 133-141, 2001.
- HOFMANN-LEHMANN, R., HOLZNAGEL, E., OSSENT, P., LUTZ, H. Parameters of disease progression in long-term experimental feline retrovirus (feline immunodeficiency virus and feline leukemia virus) infections: hematology, clinical chemistry, and lymphocyte subsets. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v4, p.33-42, 1997.
- HOFMANN-LEHMANN, R., HUDER, J. B., GRUBER, S., BORETTI, F., SIGRIST, B., LUTZ, H. Feline leukaemia provirus load during the course of experimental infection and in naturally infected cats. **Journal of General Virology**, v. 82, p. 1589-1596, 2001.
- HONDATSU, T., MOTOKAWA, K., USAMI, M., AMIOKA, M., OKADA, S., KOYAMA, H. Genetic subtyping and epidemiological study of feline immunodeficiency virus by nested polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of the *gag* gene. **Journal of Virological Methods**, v70, p.107-111, 1998.

- JAIN, N. C. *Essentials of Veterinary Hematology*. Lea & Febiger: Philadelphia, 1993.
- JUNQUEIRA-JORGE, J. *Estudo dos fatores de risco da leucemia viral felina no município de São Paulo*. 2005. 43 f. Dissertação mestrado. São Paulo: Universidade de São Paulo/Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.
- LEE, I. T., LEVY, J. K., GORMAN, S. P., CRAWFORD, P. C., SLATER, M. R. Prevalence of feline leukemia virus infection and serum antibodies against feline immunodeficiency virus in unowned free-roaming cats. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 220, p. 620-622, 2002.
- LEVY, J., CRAWFORD, C., HARTMANN, K., HOFMANN-LEHMANN, R., LITTLE, S., SUNDAHL, E., THAYER, V. 2008 American Association of Feline Practitioners' feline retrovirus management guidelines. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, 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., SEARS, W., LACHTARA, J., BIENZLE, D. Seroprevalence of feline leukemia virus and feline immunodeficiency virus infection among cats in Canada. **Can Vet J**, v.50, p. 644-648, 2009.
- LURIA, B. J., LEVY, J. K., LAPPIN, M. R., BREITSCHERDT, E. B., LEGENDRE, A. M., HERNANDEZ, J. A., GORMAN, S. P., LEE, I. T. Prevalence of infectious diseases in feral cats in northern Florida. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 6, p. 287-296, 2004.
- MACIEIRA, D. B., MENEZES, R. C. A. A., DAMICO, C. B., ALMOSNY, N., MCLANE, H. L., DAGGY, J. K., MESSICK, J. B. Prevalence and risk factors for hemoplasmas in domestic cats naturally infected with feline immunodeficiency virus and/or feline leukemia virus in Rio de Janeiro-Brazil. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v.10, p. 120-129, 2008.
- MAHER, I. E., TASKER, S., POLIZOPOULOU, Z., DASOPOULOU, A., EGAN, K., HELPS, C. R., PAPASOULIOTIS, K. Polymerase chain

- reaction survey of feline haemoplasma infections in Greece. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 12, p. 601-605, 2010.
- MARÇOLA, T. G. *Estudo da avaliação laboratorial e ocorrência da infecção pelo vírus da imunodeficiência felina e coinfeções em felinos domésticos de diferentes localidades do Distrito Federal*. 2011. 67 f. Dissertação de Mestrado (M) - Universidade de Brasília/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária.
- 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.
- MATHES, L. E., PANDEY, R., CHAKRABARTI, R., HOFMAN, F. M., HAYES, K. A., STROMBERG, P., ROY-BURMAN, P. Pathogenicity of a subgroup C feline leukemia virus (FeLV) is augmented when administered in association with certain FeLV recombinants. **Virology**, v. 198, p. 185-195, 1994.
- MEINERZ, A. R. M., ANTUNES, T. A., SOUZA, L. L., NASCENTE, P. S., FARIA, R. O., CLEFF, M. B., GOMES, F. R., NOBRE, M. O., REISCHAK, D., SCHUCH, L. F. D., MEIRELES, M. C. A. Frequência do vírus da leucemia felina (VLF_e) em felinos domésticos (*Felis catus*) semidomiciliados nos municípios de Pelotas e Rio Grande. **Ci Anim Bras**, v. 11, p. 90-93, 2010.
- MICROSOFT CORPORATION. 2008. Microsoft Office Excel, versão 2007
- MIYAZAWA, T., JARRET, O. Feline leukaemia virus proviral DNA detected by polymerase chain reaction in antigenaemic but non-viraemic ('discordant') cats. **Archives of Virology**, v. 142, p. 323-332, 1997.
- MURPHY, F.A., PAUL, E., GIBBS, J., HORZINEK, M. C., STUDDERT, M. J. **Veterinary Virology**. 3^o ed. California: Elsevier, 1999.641p.
- NEIL, J. C. Feline leukemia and sarcoma viruses. In: **Encyclopedia of Virology**. 3^o ed. pg. 185-190. Oxford: Elsevier, 2008.
- PAN, J., AL-DUBAIB, M., LIAO, C., FUJINO, Y., HINTON, D. R., HAYNES, K. A., MATHES, L. E., ROY-BURMAN, P. In vivo expression of GFP transgene delivered via a replicating feline leukemia virus. **Veterinary Microbiology**, v. 110, p. 181-195, 2005.

- PEDERSEN, N. C., TORTEN, M., RIDEOUT, B., SPARGER, E., TONACHINI, T., LUCIW, P. A., ACKLEY, C., LEVY, N., YAMAMOTO, J. Feline leukemia virus infection as a potentiating cofactor for the primary and secondary stages of experimentally induced feline immunodeficiency virus infection. **Journal of Virology**, v. 64, p. 598-606, 1990.
- RAVI, M., WOBESER, G. A., TAYLOR, S. M., JACKSON, M. L. 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.
- RIEGEL, C. M., STOCKHAM, S. Anemia associated with bacterial and viral infections. In: **Schalm's Veterinary Hematology**. 5^o edição. Cap. 32, pg. 216-225, 2000.
- ROURA, X., PETERS, I. R., ALTET, L., TABAR, M., BARKER, E. N., PLANELLAS, M., HELPS, C. R., FRANCINO, O., SHAW, S. E., TASKER, S. Prevalence of hemotropic mycoplasmas in healthy and unhealthy cats and dogs in Spain. **J Vet Diagn Invest**, v. 22, p. 270-274, 2010.
- SILVA, F. R. C. *Prevalência das infecções pelo vírus da leucemia viral felina e da imunodeficiência viral felina na cidade de Porto Alegre*. 2007. 57 f. Dissertação de mestrado. Rio Grande do Sul: Universidade Federal do Rio Grande do Sul/ Faculdade de Veterinária.
- SKYES, J. E. Feline hemotropic mycoplasmas. **Vet Clin Small Anim**, v. 40, p. 1157-1170, 2010.
- SOUZA, J. J. M., TEIXEIRA, C. H. R., GRAÇA, R. F. S. Estudo epidemiológico de infecções pelo vírus da leucemia e/ou imunodeficiência felina em gatos domésticos do município do Rio de Janeiro. **Revista Clínica Veterinária**, v. 36, p. 14-21, 2002.
- STATACORP. 2011. Stata: Release 12. Statistical Software. College Station, TX: StataCorp LP
- STEWART, H., JARRETT, O., HOSIE, M. J., WILLET, 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.
- TANDON, R., CATTORI, V., GOMES-KELLER, M. A., MELI, M. L., GOLDBERGER, M. C., LUTZ, H., HOFMANN-LEHMANN, R. Quantitation of feline leukaemia virus viral and proviral loads by TaqMan® real-time polymerase chain reaction. **Journal of Virological Methods**, v. 130, p. 124-132, 2005.
- TASKER, S. Haemotropic mycoplasmas. What's their real significance in cats? **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 12, p. 369-381, 2010.
- TEIXEIRA, B. M., RAJÃO, D.S., HADDAD, J. P. A., LEITE, R. C., REIS, J. K. P. 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, p. 939-942, 2007.
- TIQUE, V., SÁNCHEZ, A., ÁLVAREZ, L., RÍOS, R., MATTAR, S. Seroprevalence del virus de leucemia e inmunodeficiencia felina en gatos de Montería, Córdoba. **Rev Med Vet Zoot**, 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, p. 272-283, 2005.
- TZAVARAS, T., STEWART, M., MCDOUGALL, A., FULTON, R., TESTA, N., ONIONS, D. E., NEIL, J. C. Molecular cloning and characterization of a defective recombinant feline leukaemia virus associated with myeloid leukaemia. **Journal of General Virology**, v. 71, p. 343-354, 1990.
- WEISER, M. G., KOOIBA, G. J. Erythrocyte macrocytosis in feline leukemia virus associated anemia. **Veterinary Pathology**, v.20, p. 687-697, 1983.
- WEISS, D. J. Aplastic anemia in cats - clinicopathological features and associated disease conditions 1996-2004. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 8, p. 203-206, 2006.
- WILLI, B., BORETTI, F. S., BAUMGARTNER, C., TASKER, S., WENGER, B., CATTORI, V., MELI, M. L., REUSCH, C. E., LUTZ, H., HOFMANN-LEHMANN, R. Prevalence, risk factors analysis, and follow-up of

infections caused by three feline hemoplasma species in cats in Switzerland. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, p. 961-969, 2006.

CAPÍTULO III

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Acredita-se que este estudo contribuiu para o começo da avaliação do FeLV no DF. É preciso aperfeiçoar os resultados por meio de uma investigação epidemiológica baseada em amostras probabilísticas capazes de estimar com acurácia a distribuição do vírus no DF. A partir desses dados, seria possível deduzir quais alterações hematológicas seriam esperadas em gatos FeLV positivos de acordo com a idade, condição clínica, exposição a fatores de risco e local, além da associação mais precisa do FeLV com outros patógenos. Considerando as tendências do vírus em outros países, é fundamental determinar qual padrão tem ocorrido em nossa região, uma vez que o FeLV tem grande importância na rotina clínica de felinos. Outrossim, a técnica molecular adaptada neste estudo servirá como ferramenta para futuras investigações e diagnóstico em animais com forte suspeita de infecção por FeLV.

As diversas síndromes ligadas ao vírus em estudo reforçam a importância de identificar além do provírus, o subtipo envolvido, visto que os sinais clínicos nem sempre são indicativos de infecção e muitos gatos FeLV positivos são assintomáticos; somado a isso, um diagnóstico confiável é a base para conclusões prognósticas, medidas profiláticas e uma correta monitoração de animais portadores.

As alterações hematológicas demonstradas reforçam a importância do FeLV como causador de alterações clínicas e confirma o valor de se fazer estudos com grupos padronizados de acordo com a idade, fatores de risco e condição clínica, e, da mesma forma, comparar animais de grupos compatíveis, a fim de evitar falsas conclusões causadas por fatores diferentes daqueles avaliados.

Empecilhos técnicos impossibilitaram a realização do sequenciamento dos produtos da PCR deste estudo, e posterior comparação com as cepas previamente descritas. Trata-se de uma etapa futura e fundamental, pois estabelecer fatores geográficos filogenéticos em conjunto com os achados clinicopatológicos e fatores de risco permitem conhecer com maior segurança o comportamento de distribuição do vírus na nossa região, com isso é possível elaborar medidas efetivas de controle e prevenção. Além de gerar mais informação que podem ser usadas nos próximos estudos com retrovirus.