



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**

**FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

---

**ESTUDO DA AVALIAÇÃO LABORATORIAL  
E OCORRÊNCIA DA INFECÇÃO PELO VÍRUS DA  
IMUNODEFICIÊNCIA FELINA E CO-INFECÇÕES EM  
FELINOS DOMÉSTICOS DE DIFERENTES  
LOCALIDADES DO DISTRITO FEDERAL**

**TATIANA GUERRERO MARÇOLA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM SAÚDE ANIMAL**

**BRASÍLIA-DF  
FEVEREIRO/ 2011**



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**

**FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

---

**ESTUDO DA AVALIAÇÃO LABORATORIAL  
E OCORRÊNCIA DA INFECÇÃO PELO VÍRUS DA  
IMUNODEFICIÊNCIA FELINA E CO-INFECÇÕES EM  
FELINOS DOMÉSTICOS DE DIFERENTES  
LOCALIDADES DO DISTRITO FEDERAL**

**TATIANA GUERRERO MARÇOLA**

**ORIENTADORA: PROFa. DRa. GIANE REGINA PALUDO**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM SAÚDE ANIMAL**

**PUBLICAÇÃO: 039/2011**

**BRASÍLIA-DF  
FEVEREIRO/ 2011**

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

MARÇOLA, T. G. **Estudo da avaliação laboratorial e ocorrência da infecção pelo vírus da imunodeficiência felina e co-infecções em felinos domésticos de diferentes localidades do Distrito Federal.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2011, 67p. Dissertação de Mestrado.

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

## FICHA CATALOGRÁFICA

Marçola, Tatiana Guerrero

Estudo da avaliação laboratorial e ocorrência da infecção pelo vírus da imunodeficiência felina e co-infecções em felinos domésticos de diferentes localidade do Distrito Federal / Tatiana Guerrero Marçola orientação de Giane Regina Paludo – Brasília, 2011. 67p ...

Dissertação de Mestrado (M) – Universidade de Brasília/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2011

1. Virus da imunodeficiência felina. 2. Felinos. 3. Hematologia. 4. Felinos.. 5. Co-infecção. 6. Distrito Federal I. MARÇOLA T. G. II. Título.



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

---

**ESTUDO DA AVALIAÇÃO LABORATORIAL E OCORRÊNCIA DA INFECÇÃO  
PELO VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA FELINA E CO-INFECÇÕES EM FELINOS  
DOMÉSTICOS DO DISTRITO FEDERAL.**

TATIANA GUERRERO MARÇOLA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA AO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE  
ANIMAL, COMO PARTE DOS REQUISITOS  
NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO GRAU DE  
MESTRE EM SAÚDE ANIMAL.

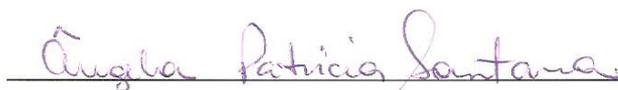
APROVADO POR:



\_\_\_\_\_  
Giane Regina Paludo, Profa. Dra. (Universidade de Brasília)



\_\_\_\_\_  
Simone Perecmanis Profa. Dra. (Universidade de Brasília)



\_\_\_\_\_  
Angela Patrícia Santana, Profa. Dra. (Universidade de Brasília)

Brasília-DF, 28 de Fevereiro de 2011

## **Dedicatória**

Dedico este trabalho aos seres misteriosos, fofos e muitas vezes selvagens, dos quais sem saber me auxiliaram e tiveram papel ímpar para este projeto, sem vocês meus adorados felinos nada seria possível, minhas desculpas pela força muitas vezes utilizadas, mas que era necessário, a vocês bichinhos que muitas vezes na mais pura inocência vinham ao nosso encontro, e ao serem contidos se transformavam em rebeldes ou simplesmente em postura de submissão se deixavam manipular, a estes olhinhos de pupilas elípticas e corpos peludos, meu mais sincero obrigado, afinal este trabalho é pra vocês! Em especial ao Anor.

## **AGRADECIMENTOS**

Assim como em todo lugar e como a maioria das pessoas, meu primeiro agradecimento é a Deus (Javé · Jeová · Senhor · Ele · Todo Poderoso · Criador · Luz · Mãe Natureza · Infinito · Davi, ou qual nome seja), por ter me dado a oportunidade de escolha e planejamento desta vida, uma vida da qual como um ser humano pedinte sempre reclamo, mas que foi desenho de um caminho maravilhoso, na qual me sinto extremamente feliz e agradecida!

Seguindo a ordem, agradeço as duas pessoas que me conceberam e me aceitaram para esta vida, que me proporcionaram ser a pessoa que sou, e ter tudo o que tenho hoje: meus pais – Cristina e Nelson, sei que mesmo longe (sejam 1200 km ou anos luz), eles sempre olham e rogam por mim, e que a vida me permita retribuir tudo o que eles me proporcionaram, seja materialmente ou sentimentalmente. Amo e sou muito grata a vocês!

A minha irmã Jordana, que apesar de distante em questão física, está sempre comigo em mente e coração. Apesar de sermos tão diferentes, ela me mostrou um caminho oposto dos estudos (rsrs), que me ajudou a aprender como me soltar e me divertir, como só ela sabe aproveitar a arte da “farra”. Valeu Jôw, te amo!

A minha família como um todo (apesar do todo se contar 10 pessoas rs). As minhas avós, Fina e Clarice, meu avô Nelson, minhas tias Marina, Márcia, meus primos Juan, Vanessa, Dean e Andressa, e aos pequenos Henrique e Ian. Obrigada por formar uma família na minha vida, os Natais seriam muito chatos sem vocês! A minha gorducha Ithil, pela insistência em ganhar carinho e atenção, pela recepção todos os dias e pela grande companhia.

Um agradecimento especial a três grandes mulheres das quais eu me espelho e tenho carinho: Uma madrinha – Fabíola Paes Leme, que foi meu ponto de início para a profissão da qual eu amo, a Patologia Clínica Veterinária. Um modelo – Nádia Almosny, por ter me recebido de portas abertas e me assegurado uma excelente orientação. E uma “mãe” – Giane Paludo, que além de orientadora, preceptora é protetora, agradeço a ela pelas excelentes oportunidades, pelo ensino, pela amizade e companhia, me acolheu e aceitou sem ao menos me conhecer, pelos quatros anos de caminhada vou ter gratidão eterna! A vocês meu muitíssimo obrigado, espero um dia poder ter um caminho semelhante ao de vocês!!!

Ao pessoal dos Labs, Pato clinica: Lais, Nanà, Marina, Thais, Marcela, Mariana, Raphaela, Carol, Aline, Cleide, Angélica e Bete (RJ). Pato vet: Ericat, Rafa, João, Edinho, Lucas, Licia, Anderson, Mario, Pablo e Sr. Francisco. MMB: Aninha, Fernando, Lud, Diego e Linus. Micro: Hudson e Anne. Parasito: Salvina (Sr. Aurino). Lamal: Pat e Ana. Hvetinho: Martha, Fernanda, Mayana, Maria, Lu, Alexandra, Beto, Bruninha, Samara, Sr. Jô. Hvetão: Ceci e Fabio. As estagiárias e agora (alguns) colegas de trabalho: Fabíola (RJ), Lú, Ana Paula I, Ana Paula II, Débora, Maia e Rodrigo.

Outras pessoas que compartilharam dos meus dias e foram de grande importância na minha caminhada: Robertinha, Larissa, Karlinha, Cris e Vini grandes companheiros de mestrado, pessoas que tenho imenso carinho! Gláucia, Marcelo e todo pessoal do Santé, muito obrigada a todos pela ajuda essencial e convívio amigo. A Rinaldo e Clarissa, que se dispuseram a me ajudar, sem nenhum tipo de obrigação ou retorno, sem vocês uma grande parte do meu projeto não teria sido realizada, serei eternamente grata pela ajuda e pela grande oportunidade!

Aos professores: Márcio, Richard, Lú, Ângela Patricia, Simone, Zé Renato, Arlete, Vítor e Cris. Meu muito obrigado pela ajuda, aulas, dúvidas, diversão e principalmente o enorme conhecimento que obtive! A secretária Kelly, por nos agüentar, ser tão prestativa e eficiente!

“Amigos são a família que Deus nos permite escolher” – Este parágrafo é para dizer o quanto sou sortuda e feliz por encontrar pessoas na minha vida. Meus grandes amigos de faculdade: Ro, Tcherma e Lora, cinco anos de graduação e uma grande amizade, adoro vocês! E especialmente a cinco pessoinhas (gangue, como diriam): Martinha (Marta Vasconcelos, atual Bittencourt), por ser mais que amiga:

irmã, pelos longos 3 anos e meio que convivemos intensamente, pelo carinho, ajuda e companheirismo, meu carinho será eterno. Ana (Anahí), por ser mais que amiga: psicóloga, pelas longas conversas no entardecer com o “Chai”, pelas risadas e “teorias”, ainda temos muito que tagarelar (com ela também acrescento o Leo e a Tia). Fê (Fernanda Firmino, ops Filgueiras), por ser mais que amiga: professora, pelos ensinamentos e paciência com minhas perguntas, além de cuidar de meus filhos (também se inclui o Richard). Tia Vanessa (Vanessa Mustafa) e Mi (Mirna Porto), mais que amigas: família, a família com todo o cuidado que ela nos dá (incluindo até sopa quando doente), foram vocês que me proporcionaram e me adotaram a família de vocês, sem contar as farras rsrs. Não tenho palavras pra dizer o quanto gosto de todas vocês e o quanto me são especiais, nas horas de diversão, nas horas de tristeza e medo de ficar só, nas horas de viajar, casar, aguar plantas, ficar doente, churrascos, vocês foram a minha família durante quatro anos, e espero que como “família” nós nunca nos afastemos, vocês “manteigas moles” que me ensinaram a chorar!! Amo vocês!!!

A responsável pelo abrigo SOS gatinhos, Fabiana, por ter me dado a oportunidade de estar coletando amostras em seu gatil e aos agentes comunitários e toda comunidade da Fercal.

A Capes e Cnpq, por me ajudarem financeiramente nos últimos dois anos.

Todos vocês fizeram parte da minha vida e ajudaram a formar a pessoa que sou hoje, muito obrigada! Se esqueci de alguém me desculpem.. É muita gente!

*O único lugar onde o sucesso vem antes do trabalho é no dicionário.*

*(Albert Einstein)*

*A dor é inevitável, o sofrimento opcional*

*(Carlos Drummond de Andrade)*

*Bem-aventurados os pacificadores, porque eles serão chamados*

*Filhos de Deus. "*

*(Mateus, 5:9)*

*Nós seres humanos, estamos na natureza para auxiliar o progresso dos animais, na mesma  
proporção que os anjos estão para nos auxiliar.*

*(Chico Xavier)*

## SUMÁRIO

Resumo	xi
Abstract	xii
Capítulo I	
Introdução	1
Referencial teórico	3
Objetivo	18
Referências	19
Capítulo II	
Introdução	26
Material e métodos	28
Resultados	36
Discussão	47
Conclusões	56
Referencial teórico	57
Capítulo III	
Considerações finais	61
Anexo 1	63

## RESUMO

O vírus da imunodeficiência felina (FIV) é um Retrovírus de distribuição mundial que acomete os felinos domésticos e selvagens. Estima-se que aproximadamente 10% de toda a população mundial de gatos domésticos esteja infectada. Marcadas diferenças existem entre as prevalências mundiais, com índices de 2,5 até 44%. No Brasil há relatos de ocorrência a partir de diagnósticos moleculares de 14%. A patogenia se apresenta como na AIDS, onde há grande depleção de linfócitos e longo período assintomático, é descrito que muitas doenças oportunistas se aproveitem desta imunossupressão, sendo por essa razão o gato utilizado como modelo animal. As alterações hematológicas são conflitantes, sendo observadas: Anemias, linfopenias, neutrofilias, bem com aumento das proteínas. *Hemoplasmas*, *Toxoplasma gondii* e o Vírus da Leucemia Felina (FeLV) estão entre as principais co-infecções associadas. Foram realizadas análises moleculares por PCR através de DNA extraídos de sangue de 200 gatos domésticos (*Felis catus*), de três regiões do Distrito Federal. A ocorrência encontrada foi de 2% para a infecção por FIV, com co-infecção de 100% por hemoplasma, 75% para FeLV e 0% para Toxoplasmose. Análises hematológicas demonstraram significância ( $p < 0,05$ ) entre o grupo infectado e não infectado para: Contagem de leucócitos, diferencial absoluto de neutrófilos, proteínas plasmáticas totais e volume corpuscular médio. A análise filogenética evidenciou subtipo B para três dos quatro animais positivos. O estudo demonstrou que a taxa de ocorrência para o vírus no Distrito Federal é bem menor que outros estados do Brasil, que são poucas as alterações hematológicas encontradas, sendo que estas não podem ser diferenciadas do vírus ou do hemoplasma e sugere-se que há outro subtipo viral além do B encontrado no Brasil

Palavras chave: Vírus da imunodeficiência felina, felino, hematologia, co-infecção.

## ABSTRACT

The Feline Immunodeficiency Virus (FIV) is a Retrovirus of worldwide distribution that affects domestic and wild cats. It is estimated that approximately 10% of the entire world population of domestic cats are infected. Wide differences exist between the prevalence worldwide, with rates of 2.5 to 44%. In Brazil there are reports of occurrence through molecular diagnostics 14%. The pathogenesis is similar as in AIDS, where there are large lymphocyte depletion and long asymptomatic period, it is reported that many opportunistic infections availed of this immunosuppression, and due this fact the cat used as an animal model. Hematological changes are controversial, being observed: Anemia, lymphopenia, neutrophilia, and an increase of the proteins. Hemoplasmas, *Toxoplasma gondii* and the Feline Leukemia Virus (FeLV) are among the leading co-associated infections. We performed molecular analysis by PCR using DNA extracted from blood of 200 domestic cats (*Felis catus*), in three regions of the Federal District. The occurrence was 2% for FIV infection, with co-infection by haemoplasma 100%, 75% for FeLV and 0% for toxoplasmosis. Haematological analysis showed significance ( $p < 0.05$ ) between infected and uninfected group to: Leukocyte count, count absolute neutrophil, serum total protein and mean corpuscular volume. The phylogenetic analysis revealed subtype B for three of four positive animals. The study showed that the rate of occurrence for the virus in the Federal District is far less than other states in Brazil, there are few hematological find, and these cannot be differentiated from the virus or haemoplasma and suggests that there are other viral subtype B found in Brazil.

Key words: Feline immunodeficiency virus, feline, hematology, co-infection.

## **CAPITULO I**

### **INTRODUÇÃO**

O vírus da imunodeficiência felina (FIV) é um *Lentivírus* de distribuição mundial que acomete os felinos domésticos, resultando em condições inflamatórias crônicas, neoplasias e infecções secundárias (Levy et al., 2008). Os gatos naturalmente infectados apresentam imunossupressão secundária, similar àquela observada na imunodeficiência humana (HIV/AIDS) (Lucas et al., 1998), sendo por essa razão utilizado como modelo animal para o HIV/AIDS.

Estima-se que aproximadamente 10% de toda a população mundial de gatos domésticos esteja infectada (Luttge et al., 2008). Em um estudo em SP com 401 animais, foi encontrado 11,7% de animais positivos, já no RJ a prevalência foi de 20,2% (Lara et al., 2008), em Lisboa há uma frequência 23% (Duarte et al., 2002), enquanto no Japão havia 12% de animais assintomáticos e 44% de sintomáticos (Hohdatsu et al., 1998). Por apresentarem sorologia positiva, aos animais imunizados, sugere-se o isolamento viral e a reação de polimerização em cadeia (PCR) como exames diagnósticos mais sensíveis (Steinrigl e Klein., 2003).

Muitos dos quadros clínicos associados com a infecção pelo FIV desenvolvem-se secundariamente a infecções oportunistas que ocorrem durante a fase imunossupressora da doença (Lucas et al., 1998). O curso clínico da infecção pelo FIV tem sido descrito basicamente em três estágios: agudo, subclínico e

terminal. Alterações hematológicas tais como linfopenia e anemia têm sido descritas, porém não são bem caracterizadas (Linenberger et al., 1991). A patogenia da doença se caracteriza por grande replicação viral, declínio de linfócitos T CD4+, supressão viral e prolongado período assintomático resultando em imunodeficiência (Obert e Hoover, 2000).

Baseado na sequência de aminoácidos da cápsula, o vírus isolado foi definido em A, B, C, D e E (Hohdatsu et al., 1998; Burkhard e Dean, 2003; Lara et al., 2008) e, esses subtipos têm distribuição em vários continentes (Burkhard e Dean, 2003; Lara et al., 2007). Enquanto não há clara associação entre subtipos e doença clínica, há evidências experimentais que isolados de FIV poderiam se manifestar de diferentes formas (Burkhard e Dean, 2003).

Considerando a escassez de informações a respeito da infecção pelo Vírus da imunodeficiência felina no Distrito Federal, e que o vírus da imunodeficiência felina acarreta uma doença grave para os felinos domésticos, bem como os animais acometidos servirem como um potencial modelo de estudo para a doença humana (AIDS), sendo mais susceptíveis a patogenias secundárias e zoonoses, fez-se a investigação da ocorrência da infecção nos gatos domésticos de diferentes localidades no Distrito Federal, bem como a elaboração de um perfil laboratorial e molecular dessas amostras.

## REFERENCIAL TEÓRICO

### Vírus e subtipos

O vírus da imunodeficiência felina (FIV) é um Retrovírus do gênero *Lentivirus*. O nome retrovírus (*retro*) deriva da transcrição reversa característica observada em todos os membros da família *Retroviridae*. Considerando a importância das doenças humanas causadas por retrovírus – entre as mais conhecidas esta a imunodeficiência adquirida humana (AIDS - HIV), diversas doenças em animais tem sido alvo de intenso estudo tais como FIV. Outras retrovírus acometem diferente espécies: vírus da anemia infecciosa equina, vírus da imunodeficiência bovina e vírus da artrite-encefalite caprina (Norris et al., 2007). Essa família é subdividida em vários gêneros: *Alpharetrovirus*, *Betaretrovirus*, *Gammaretrovirus*, *Deltaretrovirus*, *Epsilonretrovirus*, *Lentivirus* e *Spumaretrovirus* (ICTV – International Committee on Taxonomy of Viruses, 2011).

Descoberto em 1986 por Pedersen e colegas, o FIV, um retrovírus – Lentivírus, é filogeneticamente mais distante do HIV que o Lentivirus primata (Burkhard e Dean 2003), mas seu perfil estrutural protéico e transcriptase reversa assemelham-se ao HIV e ao vírus da imunodeficiência símia (SIV) (Hohdatsu et al., 1998). Foi inicialmente isolado por Davis, Califórnia, por meio da utilização de linfócitos de sangue periférico. Estudos bioquímicos e estruturais da virologia revelaram que o FIV é um retrovírus com morfologia particular, transcriptase reversa dependente de  $Mg^{2+}$  e organização genômica característica de Lentivirus (Sauter e Gasmi, 2001).

Existem três pontos principais de similaridade entre o FIV e HIV: (1) a estreita relação filogenética, que se traduz em morfologia, propriedades bioquímicas e replicação semelhantes; (2), interação vírus- hospedeiro similar, que é caracterizada pela infecção e depleção progressiva de células T-auxiliares (CD4 +) da circulação, e (3) deterioração progressiva do estado imunológico levando à síndrome de doença infecciosa degenerativa (Kolenda-Roberts et al., 2008).

Infecções por FIV causam progressiva deterioração do sistema imunitário nos gatos domésticos, fato que mimetiza a doença observada em humanos, o que leva à maior susceptibilidade às infecções oportunistas (Burkhard e Dean, 2003; Weaver et

al., 2004). O FIV acomete tanto espécies domésticas quanto selvagens, porém é pouco estudado nos animais selvagens. Identificação genética correlacionando virulência, infectividade, patogenicidade e diferenças felinos - específicas são limitadas devido à escassez da completa seqüência do genoma. (Pecon et al., 2008).

Estudos baseados na diversidade genética da região V3-V5 do gene *env* demonstram a ocorrência de 5 subtipos - A, B, C, D e E . Subseqüentes estudos demonstraram a possibilidade de caracterizar a mesma classificação utilizando sequencias de nucleotídeos da região p17-p24 do gene *gag*, que apresenta taxa de conservação mais elevada que o gene *env*, e as mutações encontradas no gene *env* fazem dele um candidato adequado para estudos filogenéticos (Lara et al., 2007).

O gene *gag* codifica proteínas estruturais para a formação da partícula viral baseado na estrutura tridimensional das proteínas Gag. Tais características morfológicas tornam-se semelhantes entre os vírus da família *Retroviridae*. Devido ao gene *gag* estar envolvido em vários passos no ciclo de vida do vírus, e a proteína codificada por ele levar a adaptação a resposta imunitária, o gene é de grande interesse em perspectivas terapêuticas (Burkala e Poss, 2007).

Enquanto não há clara associação entre subtipos e doença clínica, há evidências experimentais de que isolados de FIV têm diferentes tropismos celulares e teciduais, diferentes patogenicidades e doenças clínicas (Burkhard e Dean, 2003). Por outro lado, a extensão da variação genética tem impacto direto sobre os métodos diagnósticos baseados na reação de polimerização em cadeia (PCR), cuja utilização tem aumentado muito e auxiliado no monitoramento dessas infecções (Steinrigl e Klein, 2003).

Subtipos do vírus "A" foram isolados na Califórnia, Austrália e Europa; o subtipo "B" foi encontrado no Japão, região central e leste dos EUA e Europa; subtipo "C", no Canadá e Europa; o subtipo "D" foi somente encontrado no Japão; e o subtipo "E" na Argentina e Japão. No Brasil um estudo em MG somente identificou o subtipo "B". Sendo assim os subtipos A e B são os mais frequentemente identificados e estudos demonstram ainda a existência de subgrupos dentro do subtipo B (Lara et al., 2007).

## **População e epidemiologia**

A prevalência da infecção por FIV tem diferença marcante entre as diversas populações nos diferentes países (Norris et al., 2007). Estudos epidemiológicos mundiais mostram diferentes valores de prevalência, com taxas variando desde 2,5% até 44% (Lara et al., 2008). Contudo, quando se utilizam testes moleculares, essa prevalência reduz para 2 a 4% da população mundial de gatos (Hayward et al., 2010). Esta variabilidade na prevalência é atribuída à densidade populacional, estado reprodutor, idade, gênero e condições de moradia, em particular a frequência de visitas à rua e disputas por reprodução (Norris et al., 2007).

Em um estudo no estado de São Paulo com 401 gatos domésticos foram encontrados 11,7% positivos, sendo 75% desses machos, e em 83% dos casos os animais apresentavam sinais de imunossupressão. Um estudo no Rio Grande do Sul demonstrou infecção em 37,5% em 40 animais doentes, já no Rio de Janeiro um estudo com 126 gatos doentes e saudáveis demonstrou 20,2% de prevalência sendo que 3,7% desses casos não tinham sinal clínico (Lara et al., 2008). É provável que a maior diferença nas prevalências entre as regiões geográficas seria a dificuldade de elaborar um critério de seleção de amostras (Norris et al., 2007).

Segundo Lara et al. (2008), a prevalência encontrada foi de 14,7 % de positivos em 454 animais testados, coletados em 13 cidades do Brasil, o número de animais doentes analisados separadamente era de 29,2%, uma prevalência alta quando comparado ao grupo saudável (7,3%). Não foi observada prevalência de infecção em relação ao gênero, porém é descrito que machos têm mais predisposição à infecção devido à territorialidade e busca por comida.

## **Patogenia**

O curso típico da doença se caracteriza por uma grande replicação viral, declínio de linfócitos T CD4+, supressão viral e prolongado período assintomático resultando em imunodeficiência (Obert e Hoover, 2000). O período de latência assintomático é prolongado em alguns animais, podendo ocorrer por anos (Lara et al, 2008). O processo mais importante ocorre no estágio agudo primário da infecção,

que talvez influencie o curso subsequente da doença. O declínio da relação nos linfócitos – T CD4+/CD8+ é evidente logo após a infecção, o que é característico nas doenças imunodeficientes induzidas por Lentivirus (Beebe et al., 1994).

O FIV “*in vivo*” é observado em linfócitos T CD4+, mas também em linfócitos T CD8+, linfócitos B e monócitos circulantes. Esse tropismo ocorre, principalmente, por meio de proteínas do envelope. Primariamente a patogenia se caracteriza por progressiva incapacidade do sistema imunitário, com evidências de defeitos nos linfócitos T-auxiliares e rápida depleção na contagem de células CD4+ (Sauter e Gasmi, 2001).

Após a fase aguda, observa-se uma redução nos níveis de RNA viral na corrente sanguínea, indicando que houve supressão da replicação associada com a transição para a fase clínica assintomática da infecção. A diminuição da expressão viral nas células mononucleares do sangue periférico parece estar associada com o avanço do estado da doença e possível progressão acelerada da doença (Diehl et al., 1995).

A doença em progressão está associada também com o declínio do número de CD4+, e perda de células CD8+. Em estágio avançado da doença, há aumento do número da atividade de células T e nota-se alteração na produção de citocinas, como diminuição na produção de interleucina -2 (IL-2) e concomitante aumento na produção do fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF-  $\alpha$ ) (Holznagel et al., 1998).

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

Na infecção pelo FIV, a apoptose ocorre devido a um mecanismo de seleção negativa que talvez esteja associado com o comprometimento da reatividade de células T, importante na patogênese da doença. A morte celular ocorre por dois

mecanismos: necrose ou apoptose. Apoptose é um mecanismo fisiológico de morte celular que ocorre em parte por processos de desenvolvimento e imunomoduladores. Desta maneira, requer ativação celular e iniciação de sínteses de proteínas e ativação de endonucleases endógenas específicas (Bishop et al., 1993).

O aumento da produção de TNF- $\alpha$  tem sido descrito por induzir a apoptose em células cronicamente infectadas por FIV. Como no HIV, a doença induzida pelo FIV tem marcante perda de células T-auxiliar, teoricamente ocasionada pela diminuição na produção, aumento da destruição ou a combinação dos dois mecanismos. Já foi descrito que a infecção por FIV levaria à perda de células T-auxiliares, e a co-infecção por FeLV aumentaria esse efeito (Holznagel et al., 1998).

No trabalho “*in vitro*” de Holznagel et al. (1998), concluiu-se que o grau de apoptose de linfócitos é um indicador para progressão da doença em infecção experimental por FIV. A marcação de apoptose permitiu uma melhor descrição da fase assintomática, desde que a alteração seja antes da diminuição da contagem de células T-auxiliares, porém não foi achado evidência de que o TNF- $\alpha$  e/ou a carga viral estejam envolvidas significativamente na indução da apoptose de linfócitos.

### **Sinais Clínico-patológicos**

O curso clínico da infecção pelo FIV tem sido descrito de diversas formas por alguns autores, sendo que a descrição pode ser baseada nas manifestações clínicas ou concomitante com a patogenia. Três estágios são os mais aceitos como demonstração clínica: agudo, subclínico e terminal, porém autores descrevem mais minuciosamente estas etapas.

Arjona et al. (2007), descreve o curso clínico do FIV dividido em cinco estágios: estágio 1- caracterizado por sinais clínicos não específicos (febre, depressão, linfadenite); Estágio 2 – pode durar de um a cinco anos e é assintomático; Estágio 3 – leva de meses a anos e também se caracteriza por sinais clínicos não específicos; Estágio 4 – complexo relacionado à AIDS (ARC) com duração de vários meses a um ano, ocorre infecção secundárias (mas não por infecções oportunistas) e Estágio 5 – (FAIDS – síndrome da imunodeficiência

adquirida felina) dura vários meses, é caracterizada pelo início de infecções oportunistas.

Outros autores como Sauter e Gasmi, (2001), descrevem quatro etapas: estágio 1 - infecção primária, associada com a síndrome da infecção viral aguda, incluindo linfadenopatia generalizada, febre e neutropenia. Essa fase aguda é seguida, em muitos casos, por um período de silêncio clínico de vários anos referente à fase assintomática (Estágio 2), em que o FIV pode ser detectado nas células sanguíneas mononucleares, plasma e saliva de animais infectados. A fase assintomática é seguida por um terceiro estágio, caracterizado por vários sinais clínicos não específicos, tais como pirexia, linfadenopatia generalizada e secundária e infecções orais crônicas. O quarto estágio corresponde à total exaustão e imunodeficiência, devido à rápida depleção de células CD4+. Este período desenvolvido em vários meses é resultado do surgimento de infecções oportunistas, doenças neurológicas e tumores de várias etiologias, o que leva o animal rapidamente ao óbito.

### **Hematologia e Bioquímica**

Anormalidades hematológicas e citopenias de sangue periférico, tais como anemia, neutropenia, linfopenia e trombocitopenia são freqüentemente encontradas em gatos com FIV, entretanto as causas que levam às citopenias de múltiplas linhagens ainda não são bem entendidas (Fujino et al., 2009). A dificuldade em avaliar as conseqüências hematológicas na infecção por FIV é devido à alta prevalência de co-infecções, entre elas com FeLV (Shelton et al., 1990). Parece que fatores associados com a imunodeficiência progressiva, como o aumento de carga viral, infecções concomitantes e desnutrição tenham um papel fundamental na patogênese e nas anormalidades hematológicas que surgem durante o estágio sintomático da infecção (Linenberger et al., 1991).

Alterações hematológicas, tais como linfopenia e anemia, têm sido descritas, porém não são bem caracterizadas. Leucopenia é a característica mais visível nos animais infectados por FIV, geralmente associada à linfopenia, devido à redução no número de linfócitos CD4+, e a neutropenia também é comumente associada

(Shelton et al., 1990). Como o HIV, o FIV é um vírus T linfotrópico e causa progressivo declínio no número de linfócitos T-auxiliares (Linenberger et al., 1991).

Retroviroses estão associadas com uma variedade de anormalidades clínico patológicas nos gatos (Gleich e Hartmann, 2009). Outras alterações observadas incluem a trombocitopenia - que ocorre por meio da destruição secundária periférica de plaquetas - e a anemia talvez em parte como reflexo do bloqueio inflamatório da reutilização de ferro. Desta maneira, assim como na AIDS, a qual 65% a 95% dos pacientes infectados têm hematócrito abaixo de 40%, animais com FIV apresentariam a mesma característica (Shelton et al., 1990).

Gleich e Hartmann (2009), verificaram em seu trabalho baixa frequência de desenvolvimento de anemia, porém neutropenia foi uma observação comum. Um importante achado foi a prevalência de pouca linfopenia e alta concentração de proteínas devido ao aumento de  $\gamma$ -globulinas e à ativação de linfócitos B - com subsequente hipergamaglobulinemia - que já tinham sido descritas por outros autores e também em humanos com HIV.

O FIV leva a uma pequena perda na composição celular normal da medula óssea. Alguns estudos que demonstram a infecção nas células do estroma da medula óssea têm sugerido associação com neutropenia e alteração da função hematopoiética normal. Estudos anteriores demonstraram 71% a 75% de alteração em alguma linhagem hematológica em animais infectados por FIV (Fujino et al., 2009). Entretanto, no estudo "in vitro" de Linenberger et al. (1991), com linhagens celulares de nove animais assintomáticos, verificou-se que a frequência de fatores de crescimento de colônias nos animais infectados era equivalente à de animais não infectados.

Em animais naturalmente infectados, há presença de citopenias e morfologias anormais na medula, que frequentemente acompanham o estágio sintomático da infecção crônica, mas geralmente não são achados durante a fase assintomática que precede a doença clínica por meses ou anos (Linenberger et al., 1991). Pouco se sabe sobre a fase assintomática da doença. Parâmetros bioquímicos e hematológicos têm sido avaliados em animais naturalmente infectados, no entanto vários fatores como idade, condição de vida do animal e co-infecções podem contribuir para alteração dos parâmetros analisados (Hofmann-Lehmann et al., 1997).

Alguns mecanismos multifatoriais de citopenias no sangue periférico devido ao FIV têm sido propostos: 1- infecção dos precursores hematopoiéticos e estroma da medula óssea pode induzir alterações mielodisplásicas e causar hematopoiese inefetiva; 2 – infecções das células do estroma da medula óssea podem alterar a habilidade hematopoiética devido à inibição do crescimento das células da medula óssea; 3 – imunomodulação pelo FIV talvez causaria destruição imunomediada de tanto das células infectadas como das não infectadas, de acordo com o observado no HIV (Fujino et al., 2009).

### **Transmissão**

No ambiente natural, devido a lutas por território, reprodução e comida; as mordidas são o modo mais efetivo de transmissão do vírus, e a alta prevalência é observada em regiões onde os gatos têm acesso a rua. (Lara et al., 2008). Uma grande quantidade do FIV na saliva de gatos infectados seria uma forma eficiente de inoculação, devido aos dentes caninos servirem como defesa do felino. Devido ao fato do FIV estar presente em diferentes líquidos como sangue, plasma, soro, líquor e saliva, a inoculação subcutânea ou intraperitoneal de produtos de sangue de gatos infectados é uma rota potencial de infecção (Linenberg et al., 1991).

Como na infecção por HIV, a transmissão vertical do FIV pode ocorrer no útero, no momento do parto e pós-natal, via leite. Sugere-se que o FIV esteja seletivamente concentrado no colostro de gatas infectadas - apesar do baixo nível de provírus nas células do leite -, isso sugere que a glândula mamária secrete efetivamente vírus no leite, o que parece ocorrer também no HIV. A marcante diferença entre as cargas virais presentes no plasma e no leite, sugere que o vírus é ativamente concentrado no início da lactação (Allison e Hoover, 2003).

No trabalho realizado por O'neil et al. (1995), gatas infectadas no primeiro trimestre de gestação tiveram filhotes com maiores taxas de natimortos e de mortes neonatais, do que aquelas infectadas mais próximas ao parto. As elevadas taxas de natimortos e de morte neonatal, talvez sejam devido à alta carga viral materna durante a organogênese fetal.

## **Co-infecções**

Gatos infectados com FIV apresentam vários sinais clínicos, dependendo de qual agente oportunista está presente. As co-infecções não virais mais comumente observadas nesses animais incluem: *Chlamydophila spp.* hemoplasmas e *Toxoplasma gondii* (Mendes-de-Almeida et al., 2007), enquanto que as mais freqüentes viroses felinas são herpesvírus, calicivírus, coronavírus, parvovírus e o vírus da leucemia felina (FeLV). Herpesvírus e calicivírus são os maiores agentes causadores de doenças do trato respiratório superior, assim como a *Bordetella bronchiseptica* e *Chlamydophila psittaci* ((Hofmann-Lehmann et al., 1996, Binns et al., 2000). *Cytauxzoon felis* é um parasita menos comum que pode co-infectar felinos domésticos e selvagens portadores de FIV (Mendes-de-Almeida et al., 2007).

## **Vírus da Leucemia Felina**

Gatos são susceptíveis a viroses de diferentes famílias, e infecções persistentes são freqüentemente causadas por vírus da família Retroviridae (Arjona et al., 2007). O vírus da leucemia felina e o FIV, são retrovírus que representam duas das mais comuns e importantes infecções de gatos do mundo. Shelton et al. 1990, descrevem que cerca de 12% a 33% de animais infectados por FIV sejam co-infectados por FeLV. A soroprevalência de FIV no Canadá tem índices maiores que nos USA, apresentando 4,3 % e FeLV 3,4%, (Little et al., 2010).

O vírus de leucemia felina é um retrovírus exógeno de distribuição mundial e esporadicamente infecta felinos selvagens. As manifestações associadas ao vírus são tipicamente divididos em doenças proliferativas ou degenerativas. Gatos infectados por FIV têm quatro vezes mais probabilidade de se infectarem por FeLV, e a dupla infecção causa sinais clínicos mais severos que nos animais infectados por apenas um tipo de vírus (Arjona et al., 2007).

O controle da transmissão do vírus é difícil devido à transmissão direta, o que torna ambas infecções crônicas e sub-clínicas. A detecção do vírus pode ser intermitente e a transmissão ocorre por meio de contatos íntimos e prolongados, tal como ocorre quando as gatas infectam os filhotes no útero e por meio do leite (Mendes-de-Almeida et al., 2007).

A infecção por FeLV pode resultar em diferentes desfechos, fazendo com que gatos infectados sirvam como modelo de patogêneses de retrovíroses. A maioria dos gatos expostos ao FeLV desenvolvem uma infecção regressiva com viremia transitória ou indetectável e uma resposta imune efetiva (Helfer-Hungerbuehler et al., 2010). É comum o FeLV induzir a formação de neoplasias malignas nos gatos infectados (Mendes-de-Almeida et al., 2007). A co-infecção, em geral, leva à imunossupressão. 80% dos gatos experimentalmente infectados exibem deterioração progressiva da saúde e eventualmente morrem. Entretanto, a princípio, somente o FeLV resulta em anemia e, em menor grau, leucopenia (Mari et al., 2004).

Desordens hematológicas, particularmente citopenias devido a suspeita de mielossupressão, são achados comuns em gatos infectados por FeLV. Desordens hematológicas não neoplásicas descritas no FeLV incluem, síndrome mielodisplásica; anemia aplásica (pancitopenia); neutropenias cíclicas, persistentes ou transitórias; síndrome panleucopênica e anormalidades de plaquetas. Cerca de 10% das anemias associadas ao FeLV são regenerativas e causadas por hemólise imunomediada ou secundárias às infecções por hemoplasmas e o restante das anemias relacionadas a FeLV (90%) são arregenerativas e causadas por mielossupressão (Stützer et al., 2010).

Segundo Mari et al. (2004), dentre todas as infecções oportunistas, a pior seria a co-infecção entre FIV e FeLV, por ocasionar severa imunodeficiência. Gatos com co-infecção FIV/FeLV tem prognóstico desfavorável, já que os dois retrovírus juntos infectam todas as linhagens de células hematopoiéticas e linfóides, com parcial tropismo sobreposto.

A consequência fatal da infecção por FeLV ocorre devido à viremia, após a transmissão horizontal, resultando em infecção permanente das células da medula óssea, entre outras. Entretanto, após a fase inicial de replicação na medula óssea, a maioria dos gatos é capaz de limitar a infecção produtiva de FeLV (Suntz et al., 2010).

## Hemoplasmas

Hemoplasmas são bactérias pleomórficas Gram-negativas, que podem ter formas de bastão, esféricas ou anelares, e podem ser visualizadas individualmente ou em cadeias na superfície das hemácias. Os hemoplasmas são parasitas simples com genoma pequeno que se replicam por fissão binária (Macieira et al., 2008). São organismos incapazes de cultivo relacionados aos *Mollicutes*, antigamente descritos como gênero *Haemobartonella*. Algumas vezes esses patógenos bacterianos estão algumas vezes presentes no sangue de mamíferos tais como gatos, ratos e cães (Criado-Fornélio et al., 2003).

Gatos com acesso à rua têm mais risco de se infectar por hemoplasmas, isso apoia a hipótese de que esses gatos teriam mais contato com agentes transmitidos indiretamente por artrópodes sugadores de sangue, tais como pulgas e carrapatos. Os hemoplasmas são organismos oportunistas e patógenos potenciais, agentes imunossupressivos e têm demonstrado influência clínica no curso da doença viral (Willi et al., 2005).

Três espécies distintas têm sido descritas: ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’, *M. haemofelis* e ‘*Candidatus M. turicensis*’. A infecção pelo ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’ não resulta usualmente em anemia significativa, mas infecções experimentais pelo *M. haemofelis* causam severa anemia hemolítica (Tasker et al., 2006). Identificar a espécie correta é de grande interesse aos pesquisadores, uma vez que as diversas espécies possuem diferentes patogenicidades.

Alguns estudos descrevem que os hemoplasmas podem atuar como cofatores, acelerando a taxa de progressão de retrovírus felinos. Assim, animais com co-infecção talvez tenham mais tendência a desenvolver linfomas, leucemias e imunodeficiências (Macieira et al., 2008). Por outro lado, tem sido demonstrado que infecções em gatos imunossuprimidos com FIV e FeLV aumentam consideravelmente a possibilidade de invasão por hemoplasmas (Criado-Fornélio et al., 2003). O efeito da infecção por FIV na síndrome clínica observada na infecção com *M. haemofelis* seria influenciado pelo estágio e cepas de ambas as infecções (Tasker et al., 2006).

## ***Toxoplasma gondii***

De todos os patógenos circulantes nas populações de gatos domésticos, o *Toxoplasma gondii* talvez seja o de maior importância em saúde pública. Toxoplasmose é uma das zoonoses mais frequentemente relacionadas com a presença de gatos, que são fontes comuns de oocistos no ambiente urbano (Mendes-de-Almeida et al., 2007).

*Toxoplasma gondii* é um protozoário de mamíferos e aves, descrito inclusive em animais marinhos e em mais de 300 espécies animais. Esse parasita tem ciclo de vida complexo, que envolve relação predador-presa e é mantido no solo em ciclos envolvendo felinos, carnívoros, roedores e aves (Dabritz et al., 2007). Gatos domésticos e outros felinos servem de hospedeiro definitivo para *T. gondii* e apenas uma única espécie de parasita é conhecida (Davidson e English, 1998). No intestino dos felídeos, o parasita desenvolve reprodução sexuada resultando na produção de oocistos que são eliminados no ambiente e desta maneira herbívoros, carnívoros não felídeos e aves adquirem a infecção por ingestão acidental do oocisto no solo ou água, ou consumindo músculo infectado (Dabritz et al., 2007).

Felinos são geralmente assintomáticos, sendo que a maioria dos gatos são expostos apenas durante os 6 primeiros meses de vida, entretanto alguns animais podem desenvolver sinais clínicos não específicos, incluindo febre, perda de peso, dispnéia, polipneia, icterícia, desconforto abdominal, uveíte e retinocoroidite. Pelo fato da toxoplasmose ser amplamente disseminada entre os mamíferos, a detecção de anticorpos é um importante indício para identificar se os gatos têm tido contato com o agente e se eliminam oocistos. Gatos normalmente preservam sua imunidade e raramente eliminam oocistos, entretanto há descrições de gatos que eram previamente soropositivos e que voltaram a eliminar oocistos (Mendes-de-Almeida et al., 2007).

Embora a infecção por FIV seja responsável por alterações irreversíveis no sistema imunológico, tais alterações dependem da fase da infecção. Acredita-se que a produção de anticorpos contra antígenos T dependentes possa não requerer atividade completa das células T-auxiliar, as células-alvo do FIV. Nesse caso, é

possível admitir que, uma vez que as células B sejam ativadas, a produção de anticorpos anti-toxoplasma seja obtida (Lucas et al., 1998).

Retrovírus imunossupressoras (FIV e FeIV) aumentariam a predisposição à toxoplasmose (Davidson e English, 1998). Acredita-se que a infecção humana pelo HIV reative a infecção latente pelo *Toxoplasma* e o mesmo poderia ocorrer nos felinos infectados pelo FIV. Considerando-se o gato como hospedeiro, no qual a reativação da infecção pelo *Toxoplasma* pode resultar na eliminação de oocistos nas fezes, haveria conseqüente aumento no risco de contaminação do meio ambiente e propagação da infecção para seres humanos e outros animais domésticos (Lucas et al., 1998).

D'amore et al. (1997) levantaram a hipótese de que gatos FIV positivos apresentariam maior prevalência de anticorpos para *T. gondii*, do que animais FIV negativos. Pressupõe-se que gatos infectados com FIV induzem uma proliferação transitória de bradizoítas encistados no tecido, o que levaria ao aumento da produção de anticorpos. Outra hipótese seria que gatos co-infectados teriam anticorpos como ativação policlonal não específica de células B. A infecção direta dos linfócitos B pelo FIV levaria essas células a produzir anticorpos específicos contra certos antígenos.

Foi demonstrado que a infecção com FIV em gatos com toxoplasmose crônica pode levar à reativação do protozoário, mas esse ficaria incapaz de produzir doença clínica ou eliminação de oocistos no ambiente (D'amore et al., 1997). A importância da toxoplasmose na saúde pública reside no fato de que essa zoonose representa uma causa importante de alterações neonatais, o que torna a infecção primária na gestante e conseqüentemente a infecção do feto por via transplacentária o aspecto mais grave da toxoplasmose humana (Lucas et al., 1998).

### **Diagnóstico**

Uma variedade de tipos de testes diagnósticos tem sido avaliada, incluindo testes rápidos de triagem por antígenos e anticorpos, isolamento e detecção do vírus no plasma, e reações de polimerização em cadeia para detecção do DNA no sangue (Pinches et al., 2007).

O FIV é tipicamente diagnosticado por meio da detecção de anticorpos no sangue periférico de ELISA (enzyme linked immunosorbent assay). Falsos positivos para FIV podem ocorrer em animais muito jovens, quando ainda há anticorpos maternos presentes, devido à reação cruzada, também em vacinação com vírus inativado. Falso negativo pode ocorrer em gatos que não têm anticorpos, como pode ocorrer no intervalo de 2 a 4 meses até um ano pós infecção em estágios terminais da infecção, ou em leucopenias (Arjona et al., 2007).

Alternativas ao diagnóstico sorológico incluem isolamento viral e PCR. O isolamento viral é considerado padrão ouro para identificação do vírus e é o método de avaliação de outras técnicas. Entretanto, por ser um processo caro e demorado e pelo fato do vírus poder ser inativado durante o transporte, esta técnica não é utilizada na rotina (Levy et al., 2008).

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

A técnica de reação de polimerização em cadeia (PCR) tem se demonstrado sensível e específica na detecção de animais infectados por FIV. A técnica de PCR, como técnica de detecção viral, vem sendo empregada extensivamente na medicina humana, e com menor intensidade, devido ao custo e outras restrições de caráter prático, no diagnóstico veterinário (Caldas et al., 2000). Porém, o diagnóstico molecular como reação de polimerização em cadeia está se tornando muito popular devido a suas vantagens em relação aos métodos sorológicos (Arjona et al., 2007).

Animais vacinados respondem à imunização pela produção de anticorpos que são indistinguíveis daqueles produzidos durante a infecção natural quando se utilizam ELISA, *Western blotting* e IFA, sendo que esses anticorpos também são transferidos aos filhotes. Assim testes de avaliação sorológica são incapazes de distinguir gatos vacinados, daqueles infectados por FIV e daqueles que são ambos vacinados e infectados (Levy et al., 2008).

A importância da utilização da técnica de PCR em medicina veterinária pode ser associada a situações específicas em que não seja possível detectar anticorpos

induzidos pela infecção. Com relação ao FIV, já foi demonstrado que animais soronegativos podem reagir positivamente à detecção do DNA proviral (Caldas et al., 2000).

A detecção do provírus em células monocíticas de sangue periférico permite identificar o vírus independente da presença de anticorpos ou viremia. A técnica de PCR é extremamente sensível e o método permite teoricamente a detecção de uma única molécula em um total de  $10^5$  células (Ajorna et al., 2007).

Cabe salientar que duas reações de PCR, com oligonucleotídeos externos e internos (denominada *nested* PCR), são capazes de detectar um número maior de animais portadores do FIV. Como descrito na literatura, a *nested* PCR é uma técnica qualitativamente e quantitativamente superior à PCR simples. Há ganhos quanto à especificidade e quantidade de material amplificado (Caldas et al., 2000).

Diagnósticos precisos de FIV e FeLV são importantes para ambas as retrovirose, a fim de identificar gatos infectados e controlar a infecção e de sua transmissão (Pinches et al., 2007).

## **Tratamento**

O FIV tem sido tratado de várias formas e com eficácia variada. Os principais agentes avaliados durante 20 anos incluíam: interferons (IFNs), outros imunomoduladores e agentes antiretrovirais, isolados ou em combinação. No que diz respeito ao uso de IFNs em gatos infectados com FIV e FeLV, alguns estudos demonstram encorajamento e, algumas vezes, efeitos terapêuticos dramáticos em gatos sintomáticos bem como assintomáticos. Entretanto estudos mais recentes falharam em confirmar prévias descrições. As diferenças podem ser atribuídas, pelo menos em parte, a diferentes planejamentos de estudos, relativo aos IFNs, espécie de origem, preparação de purificação, tipos de tratamento, dosagem, horário, bem como idade e estágio patológico (Mari et al., 2004).

## **OBJETIVOS**

O presente estudo teve por objetivos:

- Definir a ocorrência natural da infecção por FIV em gatos domésticos de diferentes localizações do Distrito Federal;
- Verificar a ocorrência das principais co-infecções nos gatos com FIV;
- Avaliar o padrão hematológico dos animais com FIV e co-infecções;
- Definir os subtipos genéticos de FIV nos locais estudados.

## REFERÊNCIAS

- ALLISON, R.W. e HOOVER, E.A. Feline Immunodeficiency Virus Is Concentrated in Milk Early in Lactation. **Aids research and human retroviruses**, v19(3), p.245–253, 2003.
- 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.
- BEEBE, A. M., DUA, N., FAITH, T. G., MOORE, P. F., PEDERSEN, N. C., DANDEKAR, S., Primary Stage of Feline Immunodeficiency Virus Infection. **Journal of virology**, v68(5), p.3080-3091, 1994.
- BINNS, S. H., DAWSON, S., SPEAKMAN, A. J., CUEVAS, L. E., HART, C. A., GASKELL, C. J., MORGAN, K. L., GASKELL, R. M. A study of feline upper respiratory tract disease with reference to prevalence and risk factors for infection with feline calicivirus and feline herpesvirus. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v2, p.123–133, 2000.
- BISHOP, S A., GRUFYDD-JONES, T. J., HARBOUR, D. A., STOKES, C. R. Programmed cell death (apoptosis) as a mechanism of cell death in peripheral blood mononuclear cells from cats infected with feline immunodeficiency virus (FIV). **Clin Exp Immunol**, v93, p.65- 71, 1993.
- BURKALA, E. E POSS, M. Evolution of feline immunodeficiency virus Gag proteins. **Virus Genes**, v35, p.251–264, 2007.
- BURKHARD, M.J. e DEAN, G. A.. Transmission and Immunopathogenesis of FIV in Cats as a Model for HIV. **Current HIV Research**, v1, p.15-29, 2003.
- CALDAS, A.P.F., LEAL, E.S., SILVA, E.F.A., RAVAZZOLO, A.P. Detecção do provírus da imunodeficiência felina em gatos domésticos pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase. **Pesq. Vet. Bras.** v20(1), p.20-25, 2000.
- CRIADO-FORNELIO, A., MARTINEZ-MARCOS, A., BULING-SARAÑA, A., BARBARRETERO 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.

- DABRITZ, H.A., GARDNER, I.A., MILLER, M.A., LAPPIN, M.R., ATWILL, E.R., PACKHAM, A.E., MELLI, A.C., CONRAD, P.A. Evaluation of two *Toxoplasma gondii* serologic testes used in a serosurvey of domestic cats in California. **J. Parasitol.** 93(4), p.806–816, 2007.
- D'AMORE, E., FALCONE, E., BUSANI, L., TOLLIS, M. A serological survey of feline immunodeficiency virus and *Toxoplasma gondii* in stray cats. **Veterinary Research Communications**, v21, p.355-359, 1997.
- DAVIDSON, M.G. e ENGLISH R.V. Feline ocular toxoplasmosis. **Veterinary Ophthalmology**. v1, p.71-80, 1998.
- DIEHL, L. J., MATHIASON-DUBARD, C. K., O'NEIL, L. L., HOOVER, E. A. Longitudinal Assessment of Feline Immunodeficiency Virus Kinetics in Plasma by Use of a Quantitative Competitive Reverse Transcriptase PCR. *Journal virology*, v69, p.2328–2332, 1995.
- DUARTE, A., MARQUES M. I., TAVARES, L., FEVEREIRO, M. Phylogenetic analysis of five Portuguese strains of FIV. **Arch Virol**, v147, p.1061–1070, 2002.
- FUJINO, Y., HORIUCHI, H., MIZUKOSHI, F., BABA, K., GOTO-KOSHINO, Y., OHNO, K., TSUJIMOTO, H. Prevalence of hematological abnormalities and detection of infected bone marrow cells in asymptomatic cats with feline immunodeficiency virus infection. **Veterinary Microbiology**, v136, p.217–225, 2009.
- GLEICH, S., E 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, 2009.
- GREVOT A., JAUSSAUD HUGUES P., MARTY P., PRATLONG F., OZON C., HAAS P., BRETON C., BOURDOISEAU G. Leishmaniosis due to *Leishmania infantum* in a FIV and FELV positive cat with a squamous cell carcinoma diagnosed with histological, serological and isoenzymatic methods. **Parasite**, v12, p.271-275, 2005.
- HELPER-HUNGERBUEHLER, A.K., CATTORI, V., BORETTI, F.S., OSSENT, P., GREST, P., REINACHER, M., HENRICH, M., BAUER, E., BAUER-PHAM, K., NIEDERER, E., HOLZNAGEL, E., LUTZ, H., HOFMANN-LEHMANN, R. Dominance of highly divergent feline leukemia virus A progeny variants in a cat with recurrent viremia and fatal lymphoma. **Retrovirology**, v7(14), p.1-17, 2010.

- HOFMANN-LEHMANN, R., FEHR, D., GROB, M., ELGIZOLI, M., PACKER, C., MARTENSON, J.S., O'BRIEN, S. J., LUTZ H. Prevalence of Antibodies to Feline Parvovirus, Calicivirus, Herpesvirus, Coronavirus, and Immunodeficiency Virus and of Feline Leukemia Virus Antigen and the Interrelationship of These Viral Infections in Free-Ranging Lions in East Africa. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, v3, p.554–562, 1996.
- 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.
- HOHDATSU, 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.
- HOLZNAGEL, E., HOFMANN-LEHMANN, R., LEUTENEGGER, C.M., ALLENSPACH, K., HUETTNER, S., FORSTER, U., NIEDERER, E., JOLLER, H., WILLETT, B.J., HUMMEL, U., ROSSI, G.L., SCHÜPBACH, J., LUTZ, H. The Role of In Vitro-Induced Lymphocyte Apoptosis in Feline Immunodeficiency Virus Infection: Correlation with Different Markers of Disease Progression. *Journal virology*, v78, p.9025–9033, 1998.
- ICTV – International Committee on Taxonomy of Viruses, 2011 – disponível em: [http://talk.ictvonline.org/files/proposals/taxonomy\\_proposals\\_general1/m/gen01/2518.aspx](http://talk.ictvonline.org/files/proposals/taxonomy_proposals_general1/m/gen01/2518.aspx)
- KOLENDA-ROBERTS, H. M., KUHN, L., JENNINGS, R. N., MERGIA A., NAZARETH, G., JOHNSON, C. M. Immunopathogenesis of feline immunodeficiency virus infection in the fetal and neonatal cat. **Front Biosci.** v12, p.3668–3682, 2008.
- LARA, V. M., TANIWAKI, S. A., ARAÚJO, J. P., ARAÚJO JR. Occurrence of feline immunodeficiency virus infection in cats. **Ciência Rural**, v38, p.2245 -2249, 2008.

- LARA, V. M., TANIWAKI, S. A., ARAÚJO JR., J. P. Caracterização filogenética de amostras do vírus da imunodeficiência felina (FIV) do Estado de São Paulo. **Pesq. Vet. Bras.** v27, p.467-470, 2007.
- LEVY, J.K., CRAWFORD, P.C., KUSUHARA, H., MOTOKAWA, K., GEMMA, T., WATANABE, R., ARAI, S., BIENZLE, D. HOHDATSU, T. Differentiation of Feline Immunodeficiency Virus Vaccination, Infection, or Vaccination and Infection in Cats. **J Vet Intern Med** v22, p.330–334, 2008.
- LINENBERGER, M.L., SHELTON, G.H., PERSIK, M.T., ABKOWITZ, J.L. Hematopoiesis in Asymptomatic Cats Infected With Feline Immunodeficiency Virus. **Blood**, v:78, (8), p.1963-1968, 1991.
- 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**, v50, p.644–648, 2009.
- LUCAS, S. R. R., HAGIWARA, M. K., RECHE, A., GERMANO, P. M. L.. Ocorrência de anticorpos antitoxoplasma em gatos infectados naturalmente pelo vírus da imunodeficiência dos felinos. **Braz. J. vet. Res. anim. Sci.** v35, p.41-45, 1998.
- LUTTGE, B. G., SHEHU-XHILAGA, M., DEMIROV, D. G., ADAMSON, C. S., SOHEILIAN, F., NAGASHIMA, K., STEPHEN, A. G. FISHER, R. J., FREED, E. O. Molecular Characterization of Feline Immunodeficiency Virus Budding. **JOURNAL OF VIROLOGY.** v82, p.2106–2119, 2008.
- 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 e Brazil. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v10, p.120-129, 2008.
- MARI, K., MAYNARD, L., SANQUER, A., LEBREUX, B., EUN, H.M. Therapeutic Effects of Recombinant Feline Interferon- $\nu$  on Feline Leukemia Virus (FeLV)-Infected and FeLV/Feline Immunodeficiency Virus (FIV) -Coinfected Symptomatic Cats. **J Vet Intern Med.**, v18, p.477–482, 2004.
- MENDES-DE-ALMEIDA, F., LABARTHE, N., GUERRERO, J., FARIA, M.C.F., BRANCO, A.S., PEREIRA, C.D., BARREIRA, J.D., PEREIRA, M.J.S. Follow-up of the health conditions of an urban colony of free-roaming cats (*Felis catus*

- Linnaeus, 1758) in the city of Rio de Janeiro, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v147, p.9–15, 2007.
- MURPHY, F.A., GIBBS, E.P.J., HORZINEK, M.C., STUDDERT, M.J., Retroviridae. In: *Veterinary Virology*. 3<sup>rd</sup>ed. San Diego: Academic Press, 1999. p. 363.
- NORRIS, J. M., BELL, E. T., HALES, L., TORIBIO, J. LML., WHITE, J. D., WIGNEY, D. I., BARAL, R. M., MALIK R. Prevalence of feline immunodeficiency virus infection in domesticated and feral cats in eastern Australia. **Journal of Feline Medicine and Surgery** v9, p.300-308, 2007.
- OBERT, L. A. e HOOVER, E. A. Feline Immunodeficiency Virus Clade C Mucosal Transmission and Disease Courses. **Aids research and human retroviruses**, v16 (7), p.677–688, 2000.
- O'NEIL, L.L., BURKHARD, M.J., DIEHL, L.J., HOOVER, E.A. Vertical Transmission of Feline Immunodeficiency Virus. **Aids research and human retroviruses**, v1,(1), p.171-182, 1995.
- PASSOS, V.M.A., LASAR, E.B., GOTIJO, C.M.F, FERNANDER, O., DEGRAVE, W. Natural infection of a domestic cat (*Felis domesticus*) with Leishmania (*Viannia*) in the metropolitan region of Belos Horizonte, state of Minas Gerais, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v91(1), p.19-20, 1996.
- PECON-SLATTERY, J., MCCRACKEN, C. L., TROYER, J. L., VANDEWOUDE, S., ROELKE, M., SONDGEROTH, K., WINTERBACH, C., WINTERBACH, H., O'BRIEN, J. S.Genomic organization, sequence divergence, and recombination of feline immunodeficiency virus from lions in the wild. **BMC Genomics**, v9:(66), p.1-13, 2008.
- PINCHES, M.D.G., DIESEL, G., HELPS, C.R., TASKER, S., EGAN, K., GRUFFYDD-JONES, T.J. An update on FIV and FeLV test performance using a Bayesian statistical approach. **Veterinary Clinical Pathology**, v36(2), p.141-147, 2007.
- POLI, A., ABRAMO, F., BARSOTTI, P., LEVA, S., GRAMICCIA, M., LUDOVISI, A., MANCIANTI, F. Feline leishmaniosis due to *Leishmania infantum* in Italy. **Veterinary Parasitology**, v106, p.181–191, 2002.
- SAUTER, L.S. e GASMI, M. FIV vector systems. **Somatic Cell and Molecular Genetics**, v. 26, p.99-129, 2001.
- SAVANI, E.S.M.M., CAMARGO, M.C.G.O., CARVALHO, M.R., ZAMPIERI, R.A., SANTOS, M.G., D'ÁURIA, S.R.N., SHAW, J.J., FLOETER-WINTER, L.M. The

- first record in the Americas of an autochthonous case of *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum chagasi* in a domestic cat (*Felis catus*) from Cotia County, São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v120, p.229–233, 2004.
- SHELTON, G.H., LINENBERGER, M.L., GRANT, C.K., ABKOWITZ, J.L. Hematologic Manifestations of Feline Immunodeficiency Virus Infection. **Blood**, v76 (6), p.1104-1109, 1990.
- SIEBELINK, K.H.J., CHU, I., RIMMELZWAAN, G.F., WEIJER, K., HERWIJNEN, R.V., KNELL, P., EGBERINK, H.F., BOSCH, M.L., OSTERHAUS A.D.M.L. Feline Immunodeficiency Virus (FIV) Infection in the Cat as a Model for HIV Infection in Man: FIV-Induced Impairment of Immune Function. **Aids research and human retroviruses**, v6(12), p.1373-1378, 1990.
- SILVA, A.V.M., CÂNDIDO, C.D.S., PEREIRA, D.P., BRAZIL, R.C., CARREIRA, J.C.A. The first record of American visceral leishmaniasis in domestic cats from Rio de Janeiro, Brazil. **Acta Tropica**, v105, p.92–94, 2008.
- STEINRIGL, A. e KLEIN, D. Phylogenetic analysis of feline immunodeficiency virus in Central Europe: a prerequisite for vaccination and molecular diagnostics. **Journal of General Virology** v84, p.1301–1307, 2003.
- STÜTZER, B., MÜLLER, 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.** v24, p.192–197, 2010.
- SUNTZ, M., FAILING, K., HECHT, W., SCHWARTZ, D., REINACHER, M. High prevalence of non-productive FeLV infection in necropsied cats and significant association with pathological findings. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v136, p.71–80, 2010.
- TASKER, S., CANEY, S.M.A., DAY, M.J., DEAN, R.S., HELPS, C.R., KNOWLES, T.G., LAIT, F.J.P., PINCHES, M.D.G. GRUFFYDD-JONES, T.J. Effect of chronic FIV infection, and efficacy of marbofloxacin treatment, on *Mycoplasma haemofelis* infection. **Veterinary Microbiology**, v117, p.169–179, 2006.
- TEIXEIRA, B.M., LOGAN, N., CRUZ, J.C.M., REIS, J.K.P., BRANDÃO, P.E., RICHTZENHAIN, L.J., HAGIWARA, M.K., WILLETT, B.J., HOSIE, M.J. Genetic diversity of Brazilian isolates of feline immunodeficiency virus. v155, p.379–384, 2010.

- VEIR, J.K. E LAPPIN, M.R. Molecular diagnostic assays for infectious diseases in cats. **Vet Clin Small Anim.** v40, p.1189–1200, 2010.
- WEAVER, E. A., COLLISSON, E. W., SLATER, M., ZHU, G. Phylogenetic Analyses of Texas Isolates Indicate an Evolving Subtype of the Clade B Feline Immunodeficiency Viruses. **Journal of virology**, v78, p.2158–2163, 2004.
- WILLI, B., BORETTI, F.S., CATTORI, V., TASKER, S., MELI, M.L., REUSCH, C., LUTZ, H., HOFMANN-LEHMANN, R. Identification, Molecular Characterization, and Experimental Transmission of a New Hemoplasma Isolate from a Cat with Hemolytic Anemia in Switzerland. **Journal of clinical microbiology**, v43, p.2581–2585, 2005.

## **CAPÍTULO II**

### **ESTUDO DA AVALIAÇÃO LABORATORIAL E OCORRÊNCIA DA INFECÇÃO PELO VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA FELINA E CO-INFECÇÕES EM FELINOS DOMÉSTICOS DO DISTRITO FEDERAL.**

#### **INTRODUÇÃO**

Desde a descoberta do vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV -1), houve a necessidade urgente de um modelo animal para o estudo da patogênese e infecção desse vírus (Sielbelink et al., 1990). Nos gatos domésticos (*Felis catus*), a infecção pelo vírus da imunodeficiência felina (FIV) resulta em uma doença progressiva e, conseqüentemente, similar ao HIV e, desta maneira, o FIV serve como modelo genético comparativo para o HIV (Pecon-Slattey et al., 2008).

O FIV é um retrovírus, da subfamília Lentiviridae, associado à síndrome de imunodeficiência adquirida em gatos. Gatos com FIV podem permanecer assintomáticos por longos períodos de tempo (Fujino et al., 2009) e apresentam manifestações virológicas, biológicas, clínicas e hematológicas similares às da AIDS. Contudo, a patogênese que leva a anemia e neutropenia, que ocorre em 20 a 40% dos animais, é ainda desconhecida (Linenberger et al., 1991).

O marcador da infecção é a redução progressiva no número de linfócitos CD4+ circulantes, que por fim resulta em danos imunológicos, similares aquele da

AIDS (Teixeira et al., 2010). Devido à severa imunodeficiência; infecções oportunistas, complicações malignas e desnutrição estão associadas ao FIV, o que dificulta a caracterização do efeito direto da infecção do *Lentivirus* na hematopoiese (Linenberger et al., 1991).

A soroprevalência de animais positivos varia de 1% a 30% em animais domésticos (Murphy et al., 1999). O FIV tem sido classificado em cinco subtipos (A,B,C,D e E) e cepas recombinantes (Teixeira et al., 2010). Vários testes diagnósticos para FIV têm sido utilizados e comparados, tais como ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) – no qual reações falso-positivas podem ocorrer, porém o isolamento viral ou reação de polimerização em cadeia (PCR) podem confirmar o diagnóstico (Vier e Lappin, 2010).

Os objetivos deste estudo foram: avaliar a ocorrência do FIV e as alterações hematológicas e bioquímicas de gatos naturalmente infectados de três localidades de Brasília, Distrito Federal; identificar os subtipos virais que acometem os gatos nesta região e verificar a ocorrência de co-infecção de FIV com outros agentes infecciosos felinos como: vírus da leucemia felina (FeLV), hemoplasma e *Toxoplasma gondii*.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

Foram colhidas 200 amostras de sangue de gatos domésticos oriundos de três diferentes locais:

- I - constituído por 84 animais, residentes na área da Fercal, região periurbana de Brasília, abordados em suas residências;
- II - composto de 42 animais pertencentes a um abrigo de animais na região de Valparaiso-DF, Brasília;
- III - composto 74 animais atendidos no Hospital Veterinário de Pequenos Animais da Universidade de Brasília.

Os animais foram escolhidos aleatoriamente, sendo de qualquer idade, raça ou sexo, apresentando ou não sintomatologia de qualquer doença.

Este estudo teve aprovação do Comitê de ética no uso animal, CEUA – UNB.

### **1- Colheita de sangue e análise hematológica**

Foram colhidas amostras sanguíneas de todos os animais por meio de punção da veia cefálica ou jugular e acondicionadas em tubos com e sem EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético), para realização do hemograma e testes bioquímicos, a fim de avaliar as proteínas séricas e frações.

No laboratório de Patologia Clínica do Hospital de Pequenos Animais da Universidade de Brasília (Hospital Veterinário - UnB), todas as amostras com EDTA foram processadas imediatamente para a realização de hemogramas. Com o auxílio de um contador semi-automático de células para uso veterinário (ABC Vet - Horiba ABX diagnostics) foi determinado o número total de hemácias e leucócitos e a concentração de hemoglobina. O volume corpuscular médio (VCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), foram determinadas por cálculo padrão. O hematócrito (VG) foi determinado pela técnica do micro-hematócrito. As proteínas plasmáticas totais (PPT) foram determinadas com o auxílio do refratômetro. Foram preparados esfregaços de sangue total e corados com panótico para a realização do diferencial leucocitário, observação morfológica das células sanguíneas e pesquisa de hemoparasitas. As plaquetas foram diluídas em solução de Brecher (oxalato de amônio a 1%) e a contagem foi realizada em câmara de Neubauer improved®.

## **2 - Análise Bioquímica**

Para avaliação do perfil protéico dos animais, foram colhidas amostras sanguíneas e acondicionadas em tubos sem anticoagulante. Destas amostras foram obtidos soro sanguíneo, que foi utilizado para a determinação das concentrações séricas das proteínas totais (PT), albumina e globulinas.

Foram utilizados kits bioquímicos específicos (Labtest ®), seguindo recomendações do fabricante e a leitura foi realizada em um analisador bioquímico semi-automático (Bio2000 – Bioplus).

Também foi realizada eletroforese, para diferenciação das frações de proteínas, por meio de filme de kit comercial – Celmgel (CELM), em aparelho de eletroforese – FEA 250, da mesma marca.

## **3 - Extração do DNA**

Após realização do hemograma, o restante das amostras com EDTA foi congelada para posterior extração do DNA e realização da reação de polimerização em cadeia (PCR). O DNA foi extraído, no laboratório de Microbiologia e Patologia Molecular (MPM), com a utilização de kits comerciais (QIAamp DNA blood mini kit – Qiagen e Illustra blood genomicPrep Mini Spin Kit – GE Healthcare), seguindo-se as recomendações dos fabricantes. As amostras de DNA foram mantidas a -20°C até o momento da realização da PCR.

### **3.1 - PCR**

Todas as reações foram realizadas no Laboratório de Microbiologia e Patologia Molecular (MPM) da UnB. Foi utilizada água como controle negativo para verificar se houve a contaminação de qualquer reagente, assim como o sangue de gato susceptível e não infectado, para verificar a especificidade da reação; como controle positivo foi utilizado produtos de PCR positivos para o FIV, sendo que os animais positivos, também foram testados para as co-infecções (*hemoplasma*, *Toxoplasma gondii* e vírus da leucemia felina). As sequências de oligonucleotídeos utilizados neste estudo podem ser verificadas na tabela1.

Todas as reações foram realizadas no mesmo termociclador (My Cyclor, Thermal Cycler-Biorad®).

**Tabela 1. Sequências de oligonucleotídeos utilizados para PCR.**

Primer	Sequência	Reação	Gene	Referência
<b>A2</b>	AATATGACTGTATCTACTGC	FIV – externo	<i>Gag</i>	Hondatsu et al.1998
<b>S2</b>	TTTTCTTCTAGAGTACTTTCTGG	FIV – externo	<i>Gag</i>	Hondatsu et al.1999
<b>NS</b>	TATTCAAACAGTAAATGGAG	FIV – interno	<i>Gag</i>	Hondatsu et al.2000
<b>NA</b>	CTGCTTGTTGTTCTTGAGTT	FIV – interno	<i>Gag</i>	Hondatsu et al.2001
<b>B1 F</b>	GGAAGTGCATCCGTTGATGAG	<i>Toxoplasma gondii</i>	<i>B1</i>	Burg et al. 1989
<b>BI R</b>	TCTTAAAAGCGTTCGTGGTC	<i>Toxoplasma gondii</i>	<i>B2</i>	Burg et al. 1989
<b>HBT-F</b>	ATACGGCCCATATCCCTACG	<i>Mycoplasma sp</i>	<i>16 S</i>	Criado-Fornélio et al. 2003
<b>HBT-R</b>	TCGCTCCACCACTTGTTCA	<i>Mycoplasma sp</i>	<i>16 S</i>	Criado-Fornélio et al. 2003
<b>PCR-S</b>	AGCTACTGCAGTGGTGYCATTTTC	FeLV	<i>Região LTR, porção 3</i>	Cedido- UNESP, Botucatu
<b>GRI</b>	GACCAGTGATCAAGGGTGAG	FeLV	<i>Região LTR, porção 4</i>	Cedido- UNESP, Botucatu
<b>GAPDH F</b>	CCTTCATTGACCTCAACTACAT	Inibidores da PCR	<i>GAPDH</i>	
<b>GAPDH R</b>	CCAAAGTTGTCATGGATGACC	Inibidores da PCR	<i>GAPDH</i>	

### 3.2 - Identificação das amostras positivas para FIV

Para identificação de sequências específicas do gene *Gag* do FIV, foram utilizados 4 pares de oligonucleotídeos, (descritos por Hondatsu et al., 1998). As duas reações eram compostas por: 1X tampão de PCR, 10 ng de DNA, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de cada deoxinucleotídeo, 1 µM de cada oligonucleotídeo e 0,8 U de *Taq* DNA polimerase resultando em um volume final de 25µL. As condições de amplificação para ambas foram: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguidos de 50 ciclos: 95°C por 45 segundos, 58°C por 45 segundos e 72°C por 45 segundos e extensão final a 72°C por 5 minutos. Produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5%, corados com brometo de etídio e visualizados sob luz ultravioleta resultando em um produto de 329pb nos animais positivos.

### 3.3 - Identificação de co-infecção dos animais positivos para FIV, *Toxoplasma gondii*, vírus da imunodeficiência felina e Hemoplasma

Todas as amostras positivas para FIV, foram submetidas a análise por meio da PCR para diagnosticar possíveis co-infecções com outros hemoparasitas.

### **3.3.1 - *Toxoplasma gondii***

Para verificar a ocorrência de co-infecção com *Toxoplasma gondii* foram utilizados os oligonucleotídeos B1F e B1R que anelam no gene B1 resultando em um produto de 194 pb (Burg et al., 1989). Foram adicionados os seguintes componentes na mistura de PCR: 1X tampão de PCR, 10 ng de DNA, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de cada deoxinucleotídeo, 1 µM de cada oligonucleotídeo e 0,8 U de *Taq* DNA polimerase resultando em um volume final de 25µL. Os ciclos de amplificação foram: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, 30 ciclos de amplificação (desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 55°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 45 segundos) e extensão final a 72°C por 10 minutos. Os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio, sendo fotografados em transluminador sob luz UV.

### **3.3.2 - FeIV**

Para verificar a ocorrência de co-infecção com FeIV foram utilizados os oligonucleotídeos PCR-S e GR1 que anelam na região LTR, porção U3, resultando em um produto de 927 pb (oligonucleotídeos cedido – UNESP Botucatu). Foram adicionados os seguintes componentes na mistura de PCR: 1X tampão de PCR, 10 ng de DNA, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de cada deoxinucleotídeo, 1 µM de cada oligonucleotídeo e 0,8 U de *Taq* DNA polimerase resultando em um volume final de 25µL. Os ciclos de amplificação foram: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, 30 ciclos de amplificação (desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 64°C por 30 segundos [*Touchdown*], extensão a 72°C por 90 segundos) e extensão final a 94°C por 10 minutos. O produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio, sendo fotografados em transluminador sob luz UV.

### 3.3.3 - Hemoplasma

Para verificar a ocorrência de co-infecção com hemoplasma (*Candidatus Mycoplasma haemominutum*, *M. haemofelis* e *Candidatus M. turicensis*.) foram utilizados os oligonucleotídeos HBT-F e HBT-R que anelam no gene 16S RNA resultando em um produto de 600 pb (Criado-Fornelio et al., 2003). Foram adicionados os seguintes componentes na mistura de PCR: 1X tampão de PCR, 10 ng de DNA, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de cada deoxinucleotídeo, 1 μM de cada oligonucleotídeo e 0,8 U de *Taq* DNA polimerase resultando em um volume final de 25μL. Os ciclos de amplificação foram: desnaturação inicial a 94°C por 10 minutos, 30 ciclos de amplificação (desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 564°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 30 segundos) e extensão final a 72°C por 10 minutos. Os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio, sendo fotografados em transluminador sob luz UV.

### 3.4 - Avaliação da qualidade do DNA das amostras utilizadas

Para verificar a qualidade das amostras de DNA utilizadas, foi realizado uma PCR para detectar a presença de inibidores da PCR em amostras de DNA que apresentaram resultados negativos na PCR. As amostras negativas na PCR foram submetidas a uma segunda reação, utilizando oligonucleotídeos específicos para o gene da enzima GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase). Foram adicionados os seguintes componentes na mistura de PCR: 10pmol de cada oligonucleotídeo, 1X tampão da *Taq* polimerase (Invitrogen®), 5mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2μl de dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 0,8U de *Taq* platinum DNA polymerase e 2,0μl do DNA da amostra, em um volume total de 25μl. Os ciclos de amplificação foram: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, 40 ciclos de amplificação (desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 52°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 1 minuto) e extensão final a 72°C por 5 minutos. Os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio, sendo fotografados em transluminador sob luz UV.

#### **4 - Definição de subtipos virais**

Todas as amostras que obtiveram resultados positivos para a PCR foram clonadas.

##### **4.1 - Eluição das bandas e ligação do inserto ao vetor**

Com o intuito de isolar o fragmento de DNA, foi realizado o isolamento das bandas em gel de agarose 1,5%, com tamanho específico para o FIV (329bp). Os produtos amplificados na PCR e submetidos a eletroforese em gel de agarose foram eluídos utilizando-se KIT comercial - Wizard SV gel and PCR clean-up System (Promega), seguindo protocolo do fabricante.

Para as reações de ligação do fragmento de DNA obtidas no item anterior, utilizou-se o Kit de clonagem pGEM-T Easy Vector System I (Promega), seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante.

##### **4.2 - Transformação das células**

Para a realização deste procedimento, fez-se o uso de células *E.coli* cepa p-300 (doadas pela Universidade Católica de Brasília). As condições de eletroporação foram: 25 $\mu$ F, resistência mínima de 200 $\Omega$  e máxima de 700 $\Omega$ , voltagem de 1.80 KV. A reação foi executada em eletroporador Bio-Rad Gene Pulser II. No fluxo foram aliqüotadas 1 $\mu$ l da reação obtida da ligação com o vetor e homogeneizadas em 50 $\mu$ l de células competentes, após isso a reação foi colocada em uma cuveta e acoplada no eletroporador. Em seguida foi adicionado 1ml de meio LB (Luria-Bertani), homogeneizadas vagarosamente, e levadas à centrífuga, depois de formado o *pellet*, foram removidos 800 $\mu$ l do meio e o *pellet* ressuspendido em 200 $\mu$ l.

##### **4.3 - Plaqueamento e seleção de colônias**

Placas com meio LB, foram pré preparadas com IPTG (isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside 200mg/ml) e X-gal (bromo-chloro-indolyl-galactopyranoside 20mg/ml). Os 200 $\mu$ l de células com meio foram distribuídas sobre a placa utilizando

alça de Drigalski, e colocadas para crescer por 12 horas em estufa à 37°C. Para cada amostra foram escolhidas 3 ou 4 colônias brancas para replicação. Em seguida, elas foram isoladas em meio LB líquido e levadas ao “termo-shaker” por 12 horas a 37°C. Em seguida foi realizado a PCR específica (oligonucleotídeos SP6 e T7) com o plasmídeo, para garantir que possuíam os insertos desejados nas colônias escolhidas.

#### **4.4 - Isolamento dos plasmídeos – Miniprep**

Para a extração de DNA das células transformadas, foi realizada a purificação por meio de Kit comercial - Wizard Plus SV Minipreps DNA purification System (Promega), segundo orientação do fabricante e em seguida as amostras foram armazenadas a -20°C

#### **5 - Seqüenciamento e confirmação da espécie**

Para o seqüenciamento foi realizada reação para marcação de bases com fluoróforo, através de *Big Dye Terminator Sequencing Kit* (Applied Biosystems) e seqüenciador (ABI 3130XI – Applied Biosystems). O resultado foi analisado por meio de um programa de análises MEGA 5.0 (<http://www.megasoftware.net/>), e também de bibliotecas eletrônicas BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) disponível em <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/> .

#### **6 - Análise Estatística**

Para análise estatística, as amostras foram separadas em animais positivos e negativos para a infecção pelo FIV, sem distinção de localidade, e em uma segunda análise esses grupos foram separados de acordo com as localidades (Hospital veterinário, abrigo de animais e Fercal).

As variáveis: VG, número de hemácias, VCM, CHCM, número de leucócitos, bastonetes, segmentados, linfócitos, monócitos, eosinófilos, basófilos, PPT e número de plaquetas foram comparadas,

nos diferentes grupos (positivos e negativos e localidades), por meio do SAS, utilizando-se o **Duncan lines**, com intervalo de confiança de 95%.

## RESULTADOS

A figura 1 apresenta produtos no tamanho de 329 pb, conforme o local de anelamento destes oligonucleotídeos no gene *gag* do FIV, segundo Hondatsu et al. (1998).

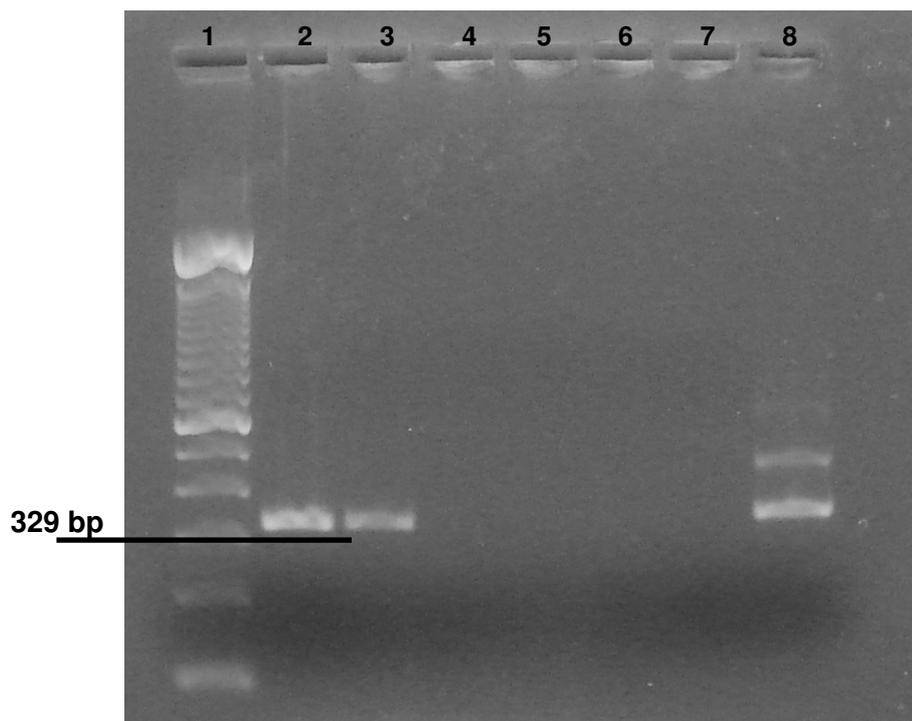


Figura 1. Resultado da PCR para FIV, utilizando os oligonucleotídeos A2, N2, NS e NA. Legenda: 1- marcador de peso molecular (100pb ,Invitrogen ®); 2 e 3 – animais positivos, 4 a 6 animais negativos, 7 controle negativo e 8: controle positivo. Gel de agarose a 1,5% (p/v) com brometo de etídeo a 0,01% (p/v).

Na PCR foram identificados 4 animais positivos para FIV nas três regiões do Distrito Federal, representando uma ocorrência de 2%.

Os resultados dos animais positivos e negativos separados por localidades estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1. - Número total e porcentagem de animais positivos e negativos para vírus da imunodeficiência felina na região da Fercal, Hospital Veterinario (HVET - FAV/UnB) e abrigo de animais.

	Positivos		Negativos	
	Número /Total	%	Número / Total	%
<b>FERCAL</b>	0/84	0	84/84	100
<b>HVET</b>	2/74	2,7	72/74	93,3
<b>ABRIGO</b>	2/64	3,2	62/64	96,8
<b>Total</b>	4/200	2	196/200	98

Na PCR para diagnóstico de co-infecção com *Toxoplasma gondii*, utilizando os oligonucleotídeos segundo Burg et al., (1989), deveriam ser observados produtos no tamanho de 194 pb, conforme o local de anelamento destes oligonucleotídeos no gene B1 (Figura 2), porém nenhum animal foi positivo para essa técnica.

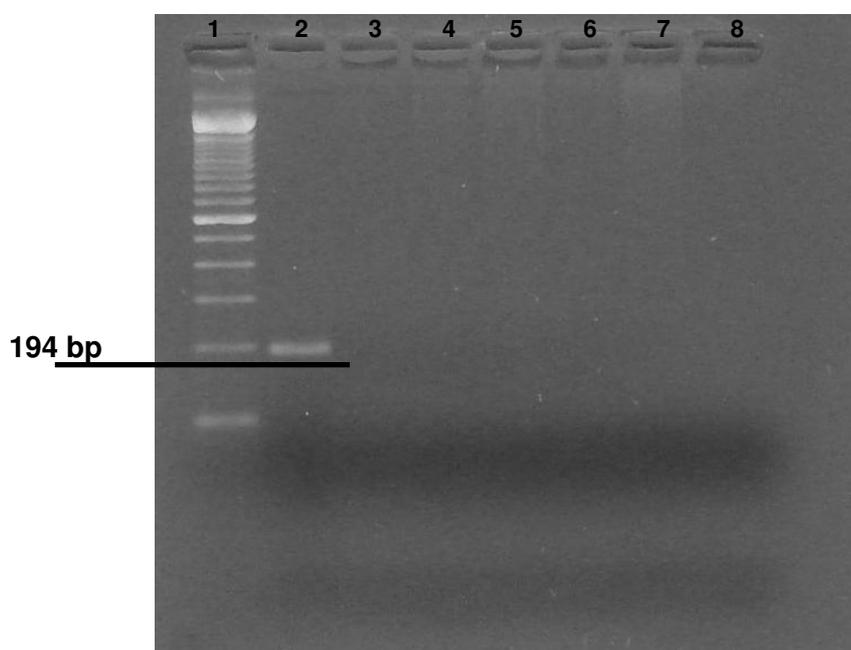
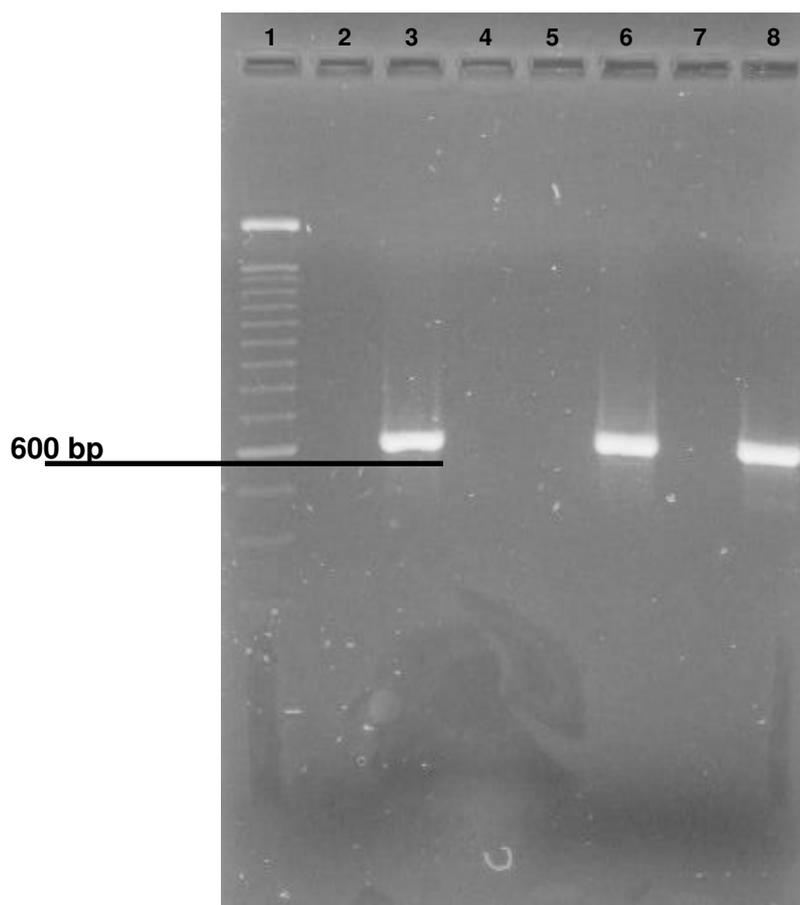


Figura 2. Resultado da PCR para *Toxoplasma gondii*, utilizando os oligonucleotídeos BIR e BIF. Legenda: 1- marcador de peso molecular (100pb ,Invitrogen ®); 2 - controle positivo, 3 a 7 – animais negativos e 8 - controle negativo. Gel de agarose a 1,5% (p/v) com brometo de etídeo a 0,01% (p/v).

Na PCR para diagnóstico de co-infecção com hemoplasma, utilizando os oligonucleotídeos segundo Criado-Fornelio et al., (2003), foram observados produtos no tamanho de 600 pb, conforme o local de anelamento destes oligonucleotídeos no gene 16S RNA (Figura 3).



**Figura 3. Resultado da PCR para *Mycoplasma sp.* utilizando os oligonucleotídeos HBT-F e HBT-R. Legenda: 1- marcador de peso molecular (100pb ,Invitrogen ®); 2 - controle negativo, 3 e 6 – animais positivos, 4,5 e 7 – animais negativos e 8 - controle positivo. Gel de agarose a 1,5% (p/v) com brometo de etídeo a 0,01% (p/v).**

Na PCR para diagnóstico de co-infecção com FeIV, foram observados produtos no tamanho de 927 pb, conforme o local de anelamento destes oligonucleotídeos na região LTR, porção U3 (Figura 4).

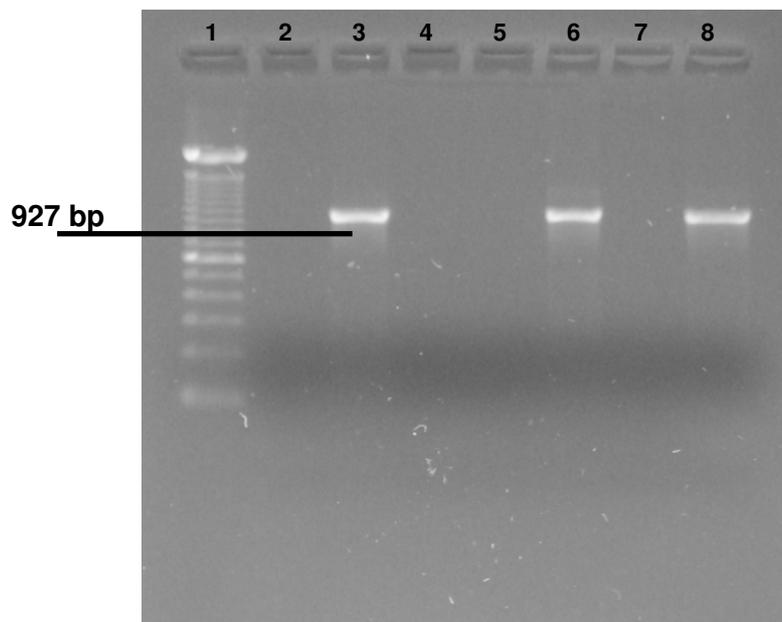


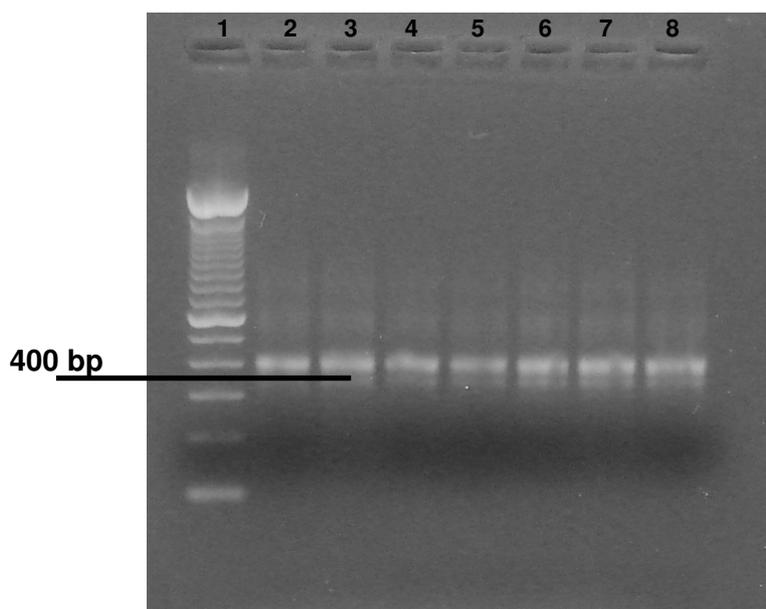
Figura 4. Resultado da PCR para FeIV, utilizando os oligonucleotídeos PCR-S e GR-1. Legenda: 1- marcador de peso molecular (100pb ,Invitrogen ®); 2 - controle negativo, 3 e 6 - animais positivos, 4,5 e 7 – animal negativo e 8 - controle positivo. Gel de agarose a 1,5% (p/v) com brometo de etídeo a 0,01% (p/v).

As co-infecções observadas nos animais positivos para o FIV estão apresentadas na tabela 2.

Tabela 2. Co-infecção dos animais positivos para FIV

Co- infecções	Número/Total	%
<i>Toxoplasma gondii</i>	0/4	0%
Hemoplasma	4/4	100%
Vírus da leucemia felina	1/4	75%

Todas as amostras negativas para FIV que foram testadas com os oligonucleotídeos GAPDH-F e GAPDH-R amplificam uma parte do gene da enzima gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase e apresentaram uma banda de 400 pb indicando êxito nas extrações de DNA (figura 5).



**Figura 5. Resultado da PCR para GAPDH, utilizando os oligonucleotídeos R e F. Legenda: 1- marcador de peso molecular (100pb ,Invitrogen ®); 2 a 8 – animais positivos. Gel de agarose a 1,5% (p/v) com brometo de etídeo a 0,01% (p/v).**

Os resultados das análises estatísticas dos hemogramas e análises bioquímicas dos animais negativos e positivos estão apresentados na tabela 3.

Os resultados das análises estatísticas dos hemogramas e análises bioquímicas dos animais infectados com FIV e com as duas retrovíroses FIV e FeIV estão apresentados na tabela 4, bem como os resultados para hemogramas dos animais com co-infecção para hemoplasma, uma vez que todos animais positivos para FIV possuíam essa co-infecção.

Os resultados dos hemogramas completos e análises bioquímicas dos animais positivos e negativos para todas localidades do Distrito Federal se encontram na tabela 5.

Os resultados dos hemogramas completos e análises bioquímicas dos animais positivos separados por localidade, com finalidade de verificar alterações significantes ( $p < 0,05$ ), estão apresentados na tabela 6.

Tabela 3. Resultado estatístico final para as análises hematológicas e bioquímicas nas três regiões do Distrito Federal.

	POSXNEG	Média	R2	Coef. de variação	Valores de Referência	Grupo	Local	Grupo x Local
<b>Hemograma</b>	VG (%)	29,15	0,11	27,17	24-45 <sup>1</sup>	NS	***	NS
	Hemácias ( $\times 10^6/\mu\text{L}$ )	7,47	0,25	28,51	5,00-10,00 <sup>1</sup>	NS	***	NS
	Hemoglobina (g/dL)	10,94	0,27	27,44	8,00-15,00 <sup>1</sup>	NS	***	NS
	VCM (fl)	40,65	0,22	19,72	39,00-55,00 <sup>1</sup>	*	***	NS
	CHCM (%)	37,51	0,2	15,67	30,00-36,00 <sup>1</sup>	NS	***	NS
	Plaquetas ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	328594	0,04	48,69	150000-500000 <sup>1</sup>	NS	NS	NS
	PPT (g/dL)	7,2	0,39	11,36	6,0-8,0 <sup>1</sup>	*	***	*
	Leucócitos ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	14464	0,32	50,02	5500-19500 <sup>1</sup>	*	***	NS
	Bastonetes (/ $\mu\text{L}$ )	38	0,15	356	0-300 <sup>1</sup>	NS	NS	NS
	Neutrófilos ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	9558	0,13	75	2500-12500 <sup>1</sup>	*	***	NS
	Linfócitos ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	3701	0,16	73,95	1500-7000 <sup>1</sup>	NS	***	NS
	Eosinófilos ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	1182	0,28	91,12	0-1500 <sup>1</sup>	NS	***	NS
	Monócitos ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	321	0,017	141	0-850 <sup>1</sup>	NS	NS	NS
	Basófilos ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	17	0,03	376,24	Raros <sup>1</sup>	NS	*	NS
<b>Bioquímico</b>	PT sérica (g/dL)	7,73	0,05	13,49	5,4-7,1 <sup>2</sup>	NS	***	#
	Albumina (g/dL)	1,98	0,16	21,58	2,6-3,3 <sup>2</sup>	NS	***	#
	Globulina (g/dL)	5,75	0,14	18,58	2,7-4,4 <sup>2</sup>	NS	***	#

Onde  $p < 0,05^*$ ,  $p < 0,01^{**}$ ,  $p < 0,001^{***}$ , POSXNEG -POSITIVOS X NEGATIVOS , Não Significativos (NS), Volume globular (VG), Volume Corpuscular Médio (VCM), Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média(CHCM), PPT (Proteínas Plasmáticas Totais), Proteínas totais (PT sérica) e # não avaliados. Valores de Referência: Fonte: Jain, 1993<sup>1</sup> e Kaneko, 1997<sup>2</sup>

Tabela 4. Análises hematológicas e bioquímicas de cada animal infectado por FIV e co-infecções com FeIV e hemoplasma estudadas no DF.

	<b>Gato 1 FIV + hemoplasma</b>	<b>Gato 2 FIV + FeIV+ hemoplasma</b>	<b>Gato 3 FIV +FeIV+ hemoplasma</b>	<b>Gato 4 FIV + FeIV + hemoplasma</b>
<b>VG</b>	19	18	36	33
<b>Hemácias</b>	2,94	3,16	8,33	7,68
<b>hemoglobinas</b>	4,90	5,90	15,10	13,00
<b>PPT</b>	8,00	9,00	8,80	7,60
<b>Leucócitos</b>	4900	5200	9700	8800
<b>Monócitos</b>	539	104	194	0
<b>Linfócitos</b>	1568	312	1261	4400
<b>Eosinófilos</b>	196	0	1485	352
<b>Segmentados</b>	2597	4784	7760	3960
<b>Basófilo</b>	0	0	0	0
<b>Bastonetes</b>	0	0	0	0
<b>Plaquetas</b>	150000	100000	442000	470000
<b>VCM</b>	64,63	56,96	43,22	42,97
<b>CHCM</b>	25,79	32,78	41,94	39,39

Tabela 5. Valores médios e desvio padrão dos parâmetros hematológicos e bioquímicos séricos nos gatos positivos e negativos para a infecção por FIV em todas as localidades do Distrito Federal.

	<b>Parâmetro</b>	<b>POSITIVOS</b>	<b>NEGATIVOS</b>	<b>Valores de referência</b>
<b>Hemograma</b>	VG (%)	26,5±9,32 <sup>a</sup>	29,2±8,25 <sup>a</sup>	24-45 <sup>1</sup>
	Hemácias (x10 <sup>6</sup> /μL)	5,52±2,8 <sup>a</sup>	7,51±2,41 <sup>a</sup>	5,00-10,00 <sup>1</sup>
	Hemoglobina (g/dL)	9,72±5,08 <sup>a</sup>	10,96±3,43 <sup>a</sup>	8,00-15,00 <sup>1</sup>
	VCM (fl)	40,42 <sup>a</sup> ±10,68	51,94±8,8 <sup>b</sup>	39,00-55,00 <sup>1</sup>
	CHCM (%)	34,97 <sup>a</sup> ±7,24	37,56±6,53 <sup>a</sup>	30,00-36,00 <sup>1</sup>
	Plaquetas (x10 <sup>3</sup> /μL)	290500 <sup>a</sup> ±192529	329414±162214 <sup>a</sup>	150000-500000 <sup>1</sup>
	PPT (g/dL)	8,35±0,66 <sup>a</sup>	7,17±1,04 <sup>b</sup>	6,0-8,0 <sup>1</sup>
	Leucócitos (X10 <sup>3</sup> / μL)	7,15±2,45 <sup>a</sup>	14,61±8,72 <sup>b</sup>	5,50-19,50 <sup>1</sup>
	Bastonetes (/ μL)	0±0 <sup>a</sup>	0,03±0,13 <sup>a</sup>	0-0,30 <sup>1</sup>
	Neutrófilos (X10 <sup>3</sup> / μL)	4,77±2,18 <sup>a</sup>	9,66±6,89 <sup>a</sup>	2,50-12,50 <sup>1</sup>
	Linfócitos(X10 <sup>3</sup> / μL)	1,88±1,75 <sup>a</sup>	3,74±3,01 <sup>a</sup>	1,50-7,00 <sup>1</sup>
	Eosinófilos (X10 <sup>3</sup> / μL)	0,25±0,20 <sup>a</sup>	1,20±1,27 <sup>a</sup>	0-1,50 <sup>1</sup>
	Monócitos(X10 <sup>3</sup> / μL)	0,20±0,23 <sup>a</sup>	0,32±0,45 <sup>a</sup>	0-0,85 <sup>1</sup>
	Basófilos (X10 <sup>3</sup> /μL)	0±0 <sup>a</sup>	0,01±0,06 <sup>a</sup>	Raros <sup>1</sup>
<b>Bioquímica</b>	PT sérica (g/dL)	8±0,42 <sup>a</sup>	7,73±1,03 <sup>a</sup>	5,4-7,1 <sup>2</sup>
	Albumina (g/dL)	1,99±0,14 <sup>a</sup>	1,98±0,46 <sup>b</sup>	2,6-3,3 <sup>2</sup>
	Globulina (g/dL)	6,01±0,28 <sup>a</sup>	5,74±1,14 <sup>a</sup>	2,7-4,4 <sup>2</sup>

Valores em uma mesma linha seguidos por letras diferentes diferiram ( $p < 0,05$ ) entre si pelo Teste de Duncan do SAS. Volume globular (VG), Volume Corpuscular Médio (VCM), Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média(CHCM), Hemoglobina Corpuscular Média (HCM), PPT (Proteína Plasmática Total) e Proteína total (PT sérica). Valores de Referência: Fonte: Jain, 1993<sup>1</sup> e Kaneko, 1997<sup>2</sup>

Tabela 6. Valores médios e desvio padrão dos parâmetros hematológicos e bioquímicos séricos nos gatos infectados por FIV nas três diferentes localidades do Distrito Federal.

	Parâmetro	Hvet	Fercal	Abrigo	Valores de referência
<b>Hemograma</b>	VG (%)	25,94±10,87 <sup>a</sup>	30,03±5,4 <sup>d</sup>	33,04±5,26 <sup>c</sup>	24-45 <sup>1</sup>
	Hemácias (x10 <sup>6</sup> /μL)	5,95±2,63 <sup>a</sup>	8,09±1,7 <sup>b</sup>	8,9±1,7 <sup>c</sup>	5,00-10,00 <sup>1</sup>
	Hemoglobina (g/dL)	8,73±3,72 <sup>a</sup>	11,71±2,4 <sup>b</sup>	13,27±2,44 <sup>c</sup>	8,00-15,00 <sup>1</sup>
	VCM (fl)	45,74±11,73 <sup>a</sup>	37,58 <sup>b</sup> ±6,34	37,83±6,02 <sup>a</sup>	39,00-55,00 <sup>1</sup>
	CHCM (%)	33,77±4,24 <sup>a</sup>	39,33 <sup>b</sup> ±4,55	40,47±7,18 <sup>b</sup>	30,00-36,00 <sup>1</sup>
	Plaquetas (x10 <sup>3</sup> /μL)	295217±191068 <sup>a</sup>	346570 <sup>a</sup> ±161246	349619±11562 <sup>a</sup>	150000-500000 <sup>1</sup>
	PPT (g/dL)	6,68±0,95 <sup>a</sup>	7,06±0,73 <sup>b</sup>	8,37±0,8 <sup>c</sup>	6,0-8,0 <sup>1</sup>
	Leucócitos(X10 <sup>3</sup> /μL)	9,88±6,43 <sup>a</sup>	14,37±6,59 <sup>b</sup>	22,71±9,95 <sup>c</sup>	5,50-19,50 <sup>1</sup>
	Bastonetes (/ μL)	0,05±0,13 <sup>a</sup>	0,03±0,16 <sup>a</sup>	0,01±0,04 <sup>a</sup>	0-0,30 <sup>1</sup>
	Neutrófilos(X10 <sup>3</sup> /μL)	8,05±5,97 <sup>a</sup>	8,30±4,76 <sup>a</sup>	14,70±8,66 <sup>b</sup>	2,50-12,50 <sup>1</sup>
	Linfócitos(X10 <sup>3</sup> / μL)	2,30±2,09 <sup>a</sup>	4,10±2,66 <sup>b</sup>	5,35±3,78 <sup>c</sup>	1,50-7,00 <sup>1</sup>
	Eosinófilos(X10 <sup>3</sup> /μL)	0,39±0,59 <sup>a</sup>	1,43±1,034 <sup>b</sup>	2,07±1,70 <sup>c</sup>	0-1,50 <sup>1</sup>
	Monócitos(X10 <sup>3</sup> / μL)	0,30±0,53 <sup>a</sup>	0,37±0,43 <sup>a</sup>	0,24±0,33 <sup>a</sup>	0-0,85 <sup>1</sup>
	Basófilos (X10 <sup>3</sup> /μL)	0,007±0,02 <sup>a</sup>	0,01±0,05 <sup>a</sup>	0,03±0,11 <sup>b</sup>	Raros <sup>1</sup>
<b>Bioquímico</b>	PT sérica (g/dL)	#	7,52±1,11 <sup>a</sup>	8,08±0,91 <sup>b</sup>	5,4-7,1 <sup>2</sup>
	Albumina (g/dL)	#	2,12±0,47 <sup>a</sup>	1,73±0,33 <sup>b</sup>	2,6-3,3 <sup>2</sup>
	Globulina (g/dL)	#	5,42±1,1 <sup>a</sup>	6,35±1,01 <sup>b</sup>	2,7-4,4 <sup>2</sup>

Valores em uma mesma linha seguidos por letras diferentes diferiram ( $p < 0,05$ ) entre si pelo Teste de Duncan do SAS. # não avaliados, Volume globular (VG), Volume Corpuscular Médio (VCM), Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média(CHCM), Hemoglobina Corpuscular Média (HCM), PPT (Proteína Plasmática Total) e Proteína total (PT sérica). Valores de Referência: Fonte: Jain, 1993<sup>1</sup> e Kaneko, 1997<sup>2</sup>

Os resultados para a eletroforese de proteína se apresentam na tabela 7.

Para confirmar a especificidade da reação, bem como verificar os possíveis subtipos virais dos quatro animais positivos, foram realizadas clonagens dos produtos de PCR e sequenciamento genético. As sequências de bases obtidas foram comparadas com aquelas de outros genes no Genbank utilizando-se o programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) disponível em <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>. Sequências das amostras 2, 3 e 4 apresentaram identidade de 95 a 98% com amostras já conhecidas do subtipo B. As sequências da amostra 5, no entanto, apareceram heterogêneas às demais (Tabela 8).

Tabela 7. Valores das frações de proteínas encontradas em dois animais positivos para FIV no abrigo de animais.

Frações (g/dL)	Gato 3	Gato 4	Referência <sup>1</sup>
<b>Albumina</b>	2.88	2.56	2,1-3,3
<b>Alfa 1 -Globulina</b>	0.59	0.51	0,2-1,1
<b>Alfa 2 – Globulina</b>	1.12	1.27	0,4-0,9
<b>Beta – Globulina</b>	0.4	0.81	0,6-1,1
<b>Gama – Globulina</b>	2.71	3.14	0,3-2,5

Kaneko, 1997<sup>1</sup>

Tabela 8 – Amostras, sequências, consensos de pares de bases encontrados e identidade de alinhamentos das amostras positivas com amostras depositadas no GenBank para o FIV e subtipos

Amostra	Clone	Sequência	Consenso bp	Subtipo	Referência	Coverage (%)	Identidade (%)
2	3	R	298	B	<a href="#">EU375642.1</a>	100	98
2	13	F;R	331	B	<a href="#">Y13867.1</a>	99	97
2	15	R	331	B	<a href="#">Y13867.1</a>	100	97
3	5	F;R	341	*	<a href="#">DQ365589.1</a>	97	96
3	16	F;R	334	*	<a href="#">DQ365589.1</a>	99	96
3	18	X	X	-	-	-	-
4	9	R	317	*	<a href="#">M59418.1</a>	100	96
4	10	F	303	B	<a href="#">EU130945.1</a>	99	95
4	20	F	320	B	<a href="#">EU130945.1</a>	99	95
4	21	F	309	*	<a href="#">DQ365589.1</a>	96	96
5	6	F;R	334	?	<a href="#">AB027304.1</a>	98	96
5	8	F;R	334	?	<a href="#">AB027304.1</a>	98	96
5	24	F;R	345	?	<a href="#">AB027304.1</a>	95	96
5	25	R	319	?	<a href="#">EF413016.1</a>	99	97

R- reverse, F- Forward, X- amostra sem seqüenciamento, \* - amostras encontradas dentro do gene, porém não há definição de subtipo, ?- amostras encontradas dentro do gene, porém de subtipo heterogêneo aos demais.

A árvore de *Neighbor Joining* demonstrou que as amostras encontradas estavam na mesma ramificação do vírus da imunodeficiência felina, suportada por alto valor de *Bootstrap* (Figuras 6 e 7). A similaridade para subtipos se encontrava

apenas nas amostras 2,3 e 4, se encaixando em ramos que pertenciam as amostras subtipo B (Aomori 1 e 2, TM2 e ITTO). A amostra número 5 se manteve fora deste ramo, encontrando-se em um ramo heterogêneo a todos os subtipos.

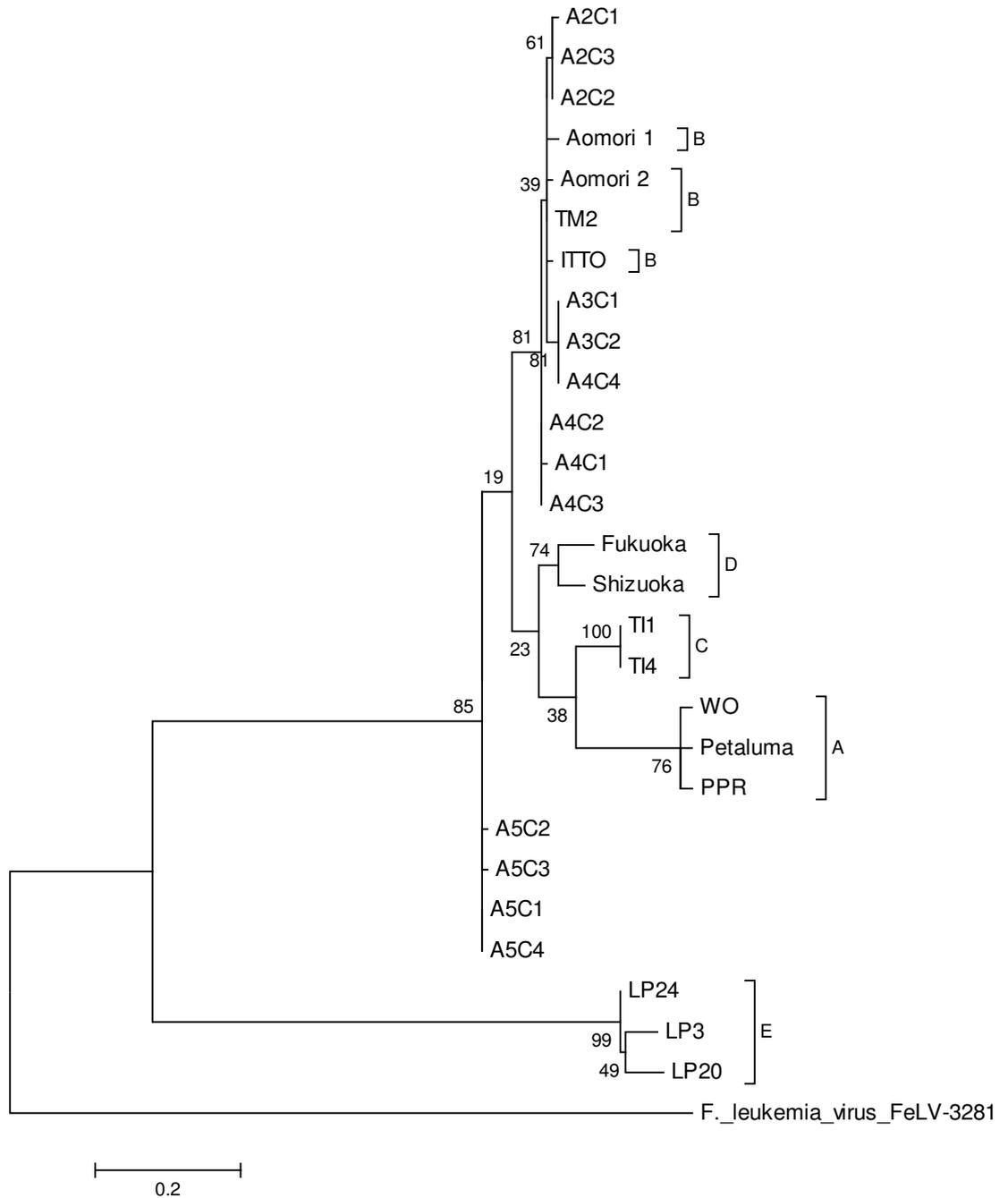


Figura 6. Árvore de *Neighbor Joining* mostrando a distância *p* entre as sequências parciais do gene *gag*. A barra de escala representa 20% de divergência entre as sequências. (A – número da amostra; C – número do clone)

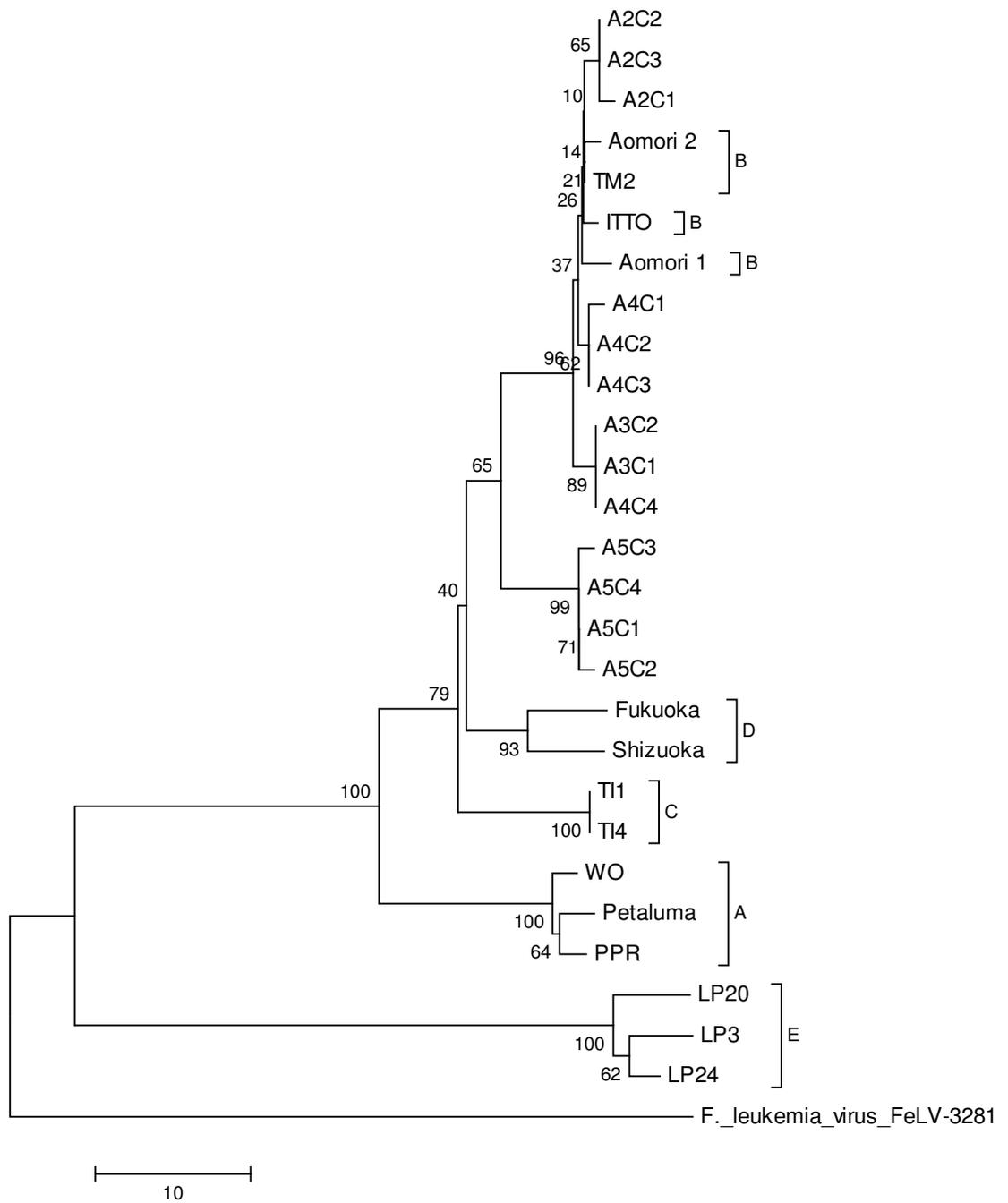


Figura 7. Árvore de *Neighbor Joining* mostrando a distância de pares de bases entre as sequências parciais do gene *gag*. A barra de escala representa 10 nucleotídeos de divergência entre as sequências. (A – número da amostra; C- número do clone)

## DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou que a freqüência da infecção pelo vírus da imunodeficiência felina nas diferentes localidades do Distrito Federal é muito baixa, apresentando uma taxa de infecção de 2% na população estudada. Entretanto, a freqüência para o vírus é muito variável em diferentes regiões do mundo. Segundo Baharak et al. (2010), a soroprevalência de FIV apresenta taxas de 1% em animais saudáveis na América do Norte, até 30% em animais doentes no Japão. Kelly et al. (2010) apresentam dados de outros países, também com alta variação: 14,6% no oeste da Índia, 22% no Vietnã, 10% na Inglaterra, 11% em Israel e 22% na Austrália. Cabe salientar que esses estudos foram baseados em análises sorológicas, nos quais os resultados obtidos podem ser elevados devido à existência de falsos positivos. Entretanto, a freqüência encontrada no Brasil por meio de teste molecular é de aproximadamente 14% (Lara et al., 2008), também uma freqüência maior do que a observada neste estudo. Vários fatores podem influenciar os dados no estudo do vírus, como a sensibilidade do teste utilizado, o tipo de compartimentalização marginal dos linfócitos observada nos felinos (Clinkenbeard e Meinkoth, 2000), a compartimentalização viral (Hayward et al., 2010) e replicação viral e efeitos locais.

A sensibilidade e especificidade do teste podem ser melhoradas quando se utiliza a *nested* PCR, ou seja, a primeira amplificação é realizada utilizando um par de oligonucleotídeos externos, seguida por uma segunda amplificação usando um par de oligonucleotídeos internos (Arjona et al., 2007). O presente estudo utilizou esta técnica de PCR e, portanto, esta justificativa não é válida para a baixa taxa da infecção encontrada.

Outra hipótese seria a compartimentalização celular (pool) descrito por Clinkenbeard e Meinkoth, (2000), na qual os gatos possuem três vezes mais linfócitos no compartimento marginal que outros animais. Considerando que os linfócitos são um dos principais sítios de replicação viral, se por acaso as células que possuem vírus em replicação fizessem parte deste compartimento, elas não estariam dentro do lúmen do vaso, não sendo puncionadas com o sangue, e assim, o vírus não teria sido detectado pela PCR. Por outro lado, gatos em condições de estresse agudo, como ocorre durante a colheita e contenção, sofrem efeito da

epinefrina e liberam essas células do compartimento, fazendo com que sejam dirigidas para o lúmen do vaso (Jain, 1993), o que leva a negativa desta hipótese.

Hayward et al. (2010), descreve outro tipo de compartimentalização, aquela ocasionada pela restrição da movimentação dos vírus entre diferentes tecidos ou células. Estudos com HIV mostram compartimentalização no trato genitourinário, SNC e intestino quando comparado ao sangue periférico de alguns indivíduos. Hudson et al. (2008), corrobora descrevendo que a infecção expõe o vírus a um rápido acesso a células mononucleares do sangue e disseminação nos órgãos, particularmente linfonodos. No estudo atual, não foi realizada pesquisa para verificação da presença do vírus em outros tecidos, porém, até o momento, não há dados mostrando uma restrição extensiva do movimento de FIV em animais naturalmente infectados (Hayward et al., 2010)

A técnica de PCR utilizada no estudo identifica o provírus. A replicação dos retrovírus necessita da transcrição reversa do RNA viral em DNA de dupla fita, que se integra ao DNA cromossomal do hospedeiro e, assim, quando a célula do hospedeiro sofre transcrição, também transcreve e traduz o mRNA viral (Murphy, 1999). Hipoteticamente outro fator que poderia ocorrer é que alguns animais infectados não estariam sob replicação viral, assim não haveria possibilidade de identificação do DNA dupla fita da transcrição reversa (provírus), já que a extração realizada no estudo era para obter DNA, porém não há citações que demonstrem essa possibilidade.

A possibilidade mais aceita para a baixa taxa de infecção por FIV encontrada no presente estudo, pode o fato de que a população felina do Distrito Federal ainda tenha tido pouco contato com o vírus. Isso pode ser explicado quando consideramos as características próprias de Brasília. Pelo fato do Distrito Federal ter sido construído há apenas cinquenta anos, a população humana é oriunda de várias regiões do Brasil e, assim sendo, os animais trazidos para a cidade também têm origem distinta (genética diferencial) e, aliado ao elevado poder aquisitivo da população residente, que possibilita a maior aquisição de animais de raça (teoricamente de animais livres do vírus) e também melhor assistência à saúde. Juntamente a este fator, a população de felinos no DF ainda é pequena e restrita, quando comparada a outras cidades que possuem aproximadamente 400 anos,

como São Paulo e Rio de Janeiro, e, logo, possuem uma população felina intensa e errante, o que contrasta com os animais do Distrito Federal.

Curiosamente, os animais que teriam maior possibilidade de terem contato com o vírus, por serem domiciliados de vida livre, eram os animais da região da Fercal, no entanto não foram encontrados animais positivos nesta localidade, denotando que provavelmente o vírus não exista naquela região. No estudo de Lara et al. (2008), verificou-se que a ocorrência da infecção em animais domiciliados com acesso à rua era superior em relação aos animais de abrigos, o que foi inesperado, devido o FIV ocasionar uma doença infecciosa, portanto mais facilmente transmitida em ambientes com alta densidade de indivíduos. Esse pensamento corrobora com o nosso estudo, onde os animais do abrigo analisado foram os que obtiveram maior ocorrência da infecção para o vírus - 3,12% -, ainda assim sendo uma taxa baixa quando comparada com os resultados mundiais.

A ocorrência obtida dentre os animais oriundos do Hvet foi de 2,7%, também baixa quando comparada a outros trabalhos. Considerando que esses animais teriam grande possibilidade de possuir o vírus, pois na sua maioria são animais atendidos por algum motivo de alteração de estado fisiológico, a reduzida taxa de infecção observada reforça a hipótese de que o vírus da imunodeficiência felina não está amplamente distribuído no DF. Lara et al. (2008) também descrevem que características como gênero, estado de saúde, estilo de vida podem estar associados com a probabilidade de infecção dentro de uma população.

No presente estudo 75% dos animais com infecção para FIV tinham co-infecção para FeLV. Recentes estudos descrevem que aproximadamente 7% dos animais com FeLV teriam co-infecção por FIV (Helfer et al., 2010). Contudo, em estudo realizado por Courchamp et al. (1997), a respeito de um modelo estatístico de epidemiologia comum para os vírus FIV e FeLV, demonstrou que FIV tem sido identificado em todas as populações, enquanto há ainda algumas populações livres de FeLV. No nosso estudo e em outros estudos em andamento (Aquino et al., 2010) verificou-se que o FeLV é um retrovírus mais comum que o FIV no Distrito Federal, reiterando as diferenças particulares anteriormente citadas referentes a esta região.

Avaliando distintamente o animal positivo somente para FIV e os animais positivos para as duas retrovíruses FIV e FeLV, verificamos que, o animal infectado apenas pelo FIV possuía alterações de igual proporção para alguns padrões

hematológicos, quando comparado aos outros animais co-infectados com FeLV. Esta análise sugere que não há diferenças hematológicas entre a infecção para os dois retrovírus, porém outros fatores também devem ser levados em consideração, como o fato de todos os animais com infecção para o FIV apresentarem também co-infecção para hemoplasma e ainda a pequena proporção de animais infectados.

O fato de todos os animais positivos para FIV estarem co-infectados com hemoplasma dificultou qualquer análise referente à anemia e reitera a necessidade de estudos futuros. Contudo, é descrito que anemias não regenerativas em gatos estão associadas a processos inflamatórios crônicos, neoplasias, endocrinopatias e também são decorrentes de viroses como FeLV e FIV. Por outro lado, relata-se que gatos infectados com estas retroviroses teriam maiores chances de se infectar por hemoplasmas (Hagiwara, 2009).

Trabalhos sugerem que diferentes espécies de hemoplasmas podem causar diferentes graus de anemia. Tasker et al. (2010), descreveram grande ocorrência de co-infecção entre FIV e *Candidatus M. turicensis*, sugerindo que esta co-infecção agiria como co-fator para a patogênese do hemoplasma. Diferenciar quais espécies de hemoplasmas infectam os animais com FIV poderia levar a uma possível distinção entre as anemias. Desta forma, não é possível prever se a anemia, encontrada em alguns animais, seria oriunda do vírus ou do hemoplasma, o que corrobora com Hagiwara (2009) para o qual a interação entre os dois levaria a maiores alterações hematológicas.

Gatos portadores de retroviroses talvez estejam sob grande risco de desenvolverem anemias quando infectados com hemoplasmas entretanto em estudos experimentais com animais naturalmente infectados com hemoplasma, e inoculados com retroviroses, observou-se o desenvolvimento da mesma anemia que em animais que tinham somente o hemoplasma (Macieira et al., 2008). Firmino (2008) demonstrou que a média da população felina do Distrito Federal infectada somente por hemoplasmas não possuía alterações hematológicas, o que implicaria ainda mais na necessidade de diferenciação entre grupos com e sem co-infecção. Nosso estudo corrobora com Firmino, (2008), pois a média dos valores do eritrograma dos animais sem infecção para o vírus, bem como a média dos animais com infecção para o vírus e o hemoplasma se mantinha dentro do padrão de referência (vide tabela 5).

Contudo, ao analisar os dados hematológicos dos animais positivos para o FIV individualmente (Tabela 4), observou-se animais que apresentam índices fora dos padrões de referência. Em nosso estudo identificou-se 4 animais positivos em 200 testados, sendo que dois desses animais eram oriundos do Hvet e dois do abrigo de animais. Separadamente, os dois animais positivos encontrados no Hvet apresentavam índices hematológicos abaixo dos valores de referência para os seguintes padrões: VG, contagem de hemácia, hemoglobina, VCM e CHCM; ambos os animais apresentavam anemia macrocítica hipocrômica, o que não ocorre nos animais do abrigo, que mantém os parâmetros dentro dos valores de referência, sendo que estes animais também apresentavam leucopenia.

Foi observado que animais positivos do Hospital Veterinário eram domiciliados e encontravam-se em estado clínico patológico pior do que aqueles do abrigo. Isso pode sugerir que apesar de infectados, os animais do abrigo ainda conseguiam manter seu estado fisiológico dentro do normal, mantendo o vírus latente, já que nenhum dos animais apresentava sinais de alteração fisiológica. Outro fato que merece destaque é que mesmo com uma população grande, a imunidade individual dos animais do abrigo foi capaz de manter o vírus em animais restritos, o que leva a pensar que são necessários mais estudos sobre transmissão e imunidade do FIV. Já nos animais do Hospital, não tem como afirmar se esses tinham ou não acesso à rua, contato com outros animais, procedência dos mesmos, ou estado de saúde, o que poderia esclarecer a origem destas alterações.

Apesar de muitos autores descreverem que a infecção por FIV é um fator de risco para a ativação de toxoplasmose em gatos, o que levaria o aumento do risco à população humana (Baharak et al., 2010), não obtivemos nenhum animal positivo com co-infecção para toxoplasmose, assim também ficaram impossibilitadas as análises hematológicas e bioquímicas. Um estudo para avaliar a dinâmica entre FIV e *Toxoplasma gondii* seria de grande importância para novas estratégias de sanidade pública. No nosso estudo, o não achado pode ser devido ao fato de utilizarmos PCR e não sorologia para o diagnóstico da toxoplasmose e que, segundo Lyon et al. (2002), a infecção aguda com alta replicação dos taquizoítas, ocorre num período de 10 a 14 dias, e após isso há transformação em bradizoítas, que se replicam mais vagarosamente e que formam cistos em tecidos, o que impossibilitaria o achado do DNA no sangue circulante.

De acordo com estudos em gatos naturalmente e experimentalmente infectados com FIV, são achados comuns: neutropenia, linfopenia, anemia e trombocitopenia (Gleich et al., 2009). No nosso estudo as médias para todo hemograma dos animais infectados e não infectados se mantiveram dentro dos padrões de referência. Isso pode ter ocorrido devido ao pequeno número de animais infectados. No entanto, diferenças ( $p < 0,05$ ) ocorreram mesmo dentro dos padrões de normalidade entre as médias dos dois grupos, positivo e negativo, e também quando feita comparação entre localidades (Tabela 3).

Valores significantes ( $p < 0,05$ ) entre os grupos positivos e negativos para o vírus foram obtidos para a contagem total de leucócitos, contagem absoluta de neutrófilos segmentados, proteína plasmática total e VCM. A ausência de linfopenias nos animais positivos do estudo seria outra característica contrastante. Normalmente é esperado que animais com retrovirose tenham linfopenias, isso pode ser explicada segundo estudo de Gleich et al. (2009), que também não observou essa característica, e afirmou que tal ausência se deve aos diferentes subtipos do vírus, patogenicidade ou estágio clínico da doença. Embora a média dos animais não apresentar linfopenia, na análise individual dos dados de dois dos quatro animais verificou-se linfopenia (tabela 4), que corrobora com Gleich et al. (2009).

Linenberger et al. (1991) verificaram que animais sintomáticos com neutrofilia demonstraram, por meio de análise sorológica, a supressão de fatores para unidades formadoras de colônias, e Gleich et al. (2009) citam que os mecanismos para as alterações hematológicas incluem alteração na celularidade e citocinas da medula óssea. No nosso estudo não foram realizadas pesquisas com o intuito de investigar as causas dos distúrbios hematológicos, bem como ficaria impossibilitada a diferenciação real de uma causa, já que todos os animais do estudo também tinham co-infecção para hemoplasma, que é descrito como responsável por grandes alterações hematológicas em animais com retrovirose. Contudo Linnenberger et al. (1991), por meio de análises de culturas de animais naturalmente infectados, demonstraram frequência normal nos progenitores eritróides e mielóides na medula.

Comparando os animais e suas localidades, foram observadas alterações ( $p < 0,05$ ) em quase todos os parâmetros (Tabela 6). Isso já era esperado, devido ao fato de serem três grupos heterogêneos. Os animais oriundos do Hvet são animais trazidos por proprietários, com alguma queixa ou histórico de moléstias, o que fica

bem demonstrado já que a média da maioria dos parâmetros hematológicos se encontra no limite inferior da referência. Os animais da Fercal, cujas amostras foram obtidas em seus domicílios e sem queixa de proprietários, apresentaram valores dentro da referência para espécie em todos os parâmetros, demonstrando estarem adaptados ao meio em que vivem, pois são animais domiciliados de vida livre e ausentes ao vírus felino. Por último os animais do abrigo, que apresentaram alterações na média para alguns parâmetros, dentre eles o que mais se destaca seria a contagem total de leucócitos apresentando leucocitose por neutrofilia. Contudo, analisando os números (ANEXO I), foi verificado que esta alteração na média ocorreu devido a alguns animais que apresentaram contagem superior a 40 mil leucócitos, o que pode ser decorrente a processos inflamatórios de diversas origens (Jain, 1993).

Em relação à significância ( $p < 0,05$ ) das proteínas plasmáticas totais (tabela 5), que nos animais com infecção para o FIV se mantiveram acima dos padrões de referência (média 8,35 g/dL), inúmeras variáveis poderiam ser levadas em consideração, bem como níveis de hidratação, e condição fisiológica dos animais. Porém Gleich et al. (2009) citam que animais naturalmente e experimentalmente infectados com o vírus desenvolvem uma aberrante hiperatividade policlonal de células B, resultando na expansão de áreas linfáticas de células B, hipergamaglobulinemia e produção de anticorpos contra uma variedade de antígenos vírus-específicos e não específicos. Em dois dos animais positivos do estudo, foi realizada a curva de proteínas através de eletroforese, na qual encontrou-se hipergamaglobulinemia (Tabela 7), estando de acordo com o descrito pelo autor.

Poucos dados sobre subtipos de FIV são encontrados no Brasil. Teixeira et al. (2010) publicaram um estudo com isolados de 3 animais, um de Minas Gerais e dois de São Paulo; Martins et al. (2008) publicaram um estudo com 26 animais do estado do Rio de Janeiro e Caxito et al. (2006) publicaram um estudo com 10 animais de Minas Gerais. Todas as sequências dos vírus descritas por esses autores pertenciam ao subtipo B, sendo que subtipos A e B são os mais encontrados no mundo (Yamamoto et al., 2007). No nosso estudo os quatro animais positivos foram clonados. Os resultados obtidos do sequenciamento (tabela 8) foram similares para 3 animais ao previamente descrito, ou seja, eram do tipo B. Contudo a análise

filogenética de um dos animais com infecção para o vírus demonstrou que o mesmo pertencia a um subtipo diferente, localizando-se em uma ramificação diferente dos demais. Observando ainda que este animal possuía valores hematológicos abaixo da referência para espécie, também sendo o único animal que não apresentou co-infecção para FeLV.

As análises de subtipos podem ser realizadas por meio de dois genes *env* e *gag*. Devido ao fato do gene *gag* ser considerado um gene mais estável, a maioria dos autores prefere utilizar o gene *env* por sua variabilidade e maior capacidade de avaliação mutacional (Teixeira et al., 2010). Embora nossas amplificações foram baseadas no gene *gag*, há uma sobreposição dos genes *gag* e *env* nas sequências de nucleotídeos amplificadas (Pistello et al., 1997), possibilitando a obtenção de sequências clonadas correspondentes também a partes do gene *env*.

Os resultados das análises gênicas para todos os isolados do subtipo B obtidos no nosso estudo apresentaram acima de 95% de identidade com outros isolados do *GenBank*. Por outro lado, os isolados do subgrupo heterogêneo estavam enquadrados com 96 e 97% de identidade aos isolados da Argentina (LP20 e LP24), descrito por Pecoraro et al. (1996) que encontraram um novo grupo diferente de todos os outros subtipos existentes na época (A,B,C e D), porém quando estes isolados foram submetidos à análise filogenética, eles se mantiveram separados tanto do subtipo da Argentina, quanto das outras amostras clonadas no estudo (figura 6 e 7), o que sugere que devido à maior estabilidade do gene testado, que há possibilidade que realmente trata-se de um subtipo diferente dos demais.

Estudos comparativos em espécies não humanas são inestimáveis ferramentas de genética molecular, sendo informativos essenciais na evolução de patógenos emergentes e provendo informações essenciais tais como identificação, associação de subtipos particulares ou novos dentro de surtos, alterações mutacionais e origem geográfica ou evolucionária. O melhor entendimento das emergências virais na população natural é possível principalmente devido aos estudos filogeográficos. (Slatery et al., 2008).

Diversidades genéticas entre os subtipos e mesmo dentro de sequências dos mesmos isolados se referem a um processo adaptativo do vírus necessário a sua evolução, essas informações são muito vastas em relação ao FIV. O conhecimento de subespécies é necessário para diferenciar sinais clínicos e patológicos bem como

desenvolver vacinas e tratamentos (Teixeira et al., 2010). Leslie et al. (2000) ainda relatam que há possibilidade de diferentes vias de transmissão entre os diferentes subtipos, o que pode ter sido observado no abrigo de gatos, já que apenas dois animais apresentaram a infecção, mesmo convivendo em um grande grupo de animais.

Em face do exposto, maiores levantamentos devem ser realizados a procura de um número maior de animais infectados por FIV no Brasil. Este estudo demonstrou a presença de diferentes subtipos virais em pequenos grupos de animais portadores do FIV em regiões restritas. Assim mais pesquisas para avaliação clínica, interação de subtipos e rastreamento da origem destes animais seriam de extrema importância para uma melhor caracterização desta retrovírose no Distrito Federal.

## CONCLUSÃO

O resultado do estudo realizado nas diferentes regiões do Distrito Federal, nos permitiu concluir:

- A ocorrência do vírus da imunodeficiência felina é baixa (2%);
- Co-infecções com hemoplasma e vírus da leucemia felina foram achados comuns e sugere-se que somente há alterações hematológicas quando há co-infecção;
- Alterações hematológicas apresentadas nos animais infectados por FIV ocorreram apenas na contagem total de leucócitos, no diferencial de neutrófilos, no volume corpuscular médio e nas proteínas plasmáticas totais;
- A maioria dos subtipos encontrados foi caracterizada como sendo do subtipo B e ainda foi identificado um subtipo não caracterizado no Brasil.

## REFERÊNCIAS

- AQUINO, L.C., MARCOLA, T.G., MUSTAFA, V.S., GUEDES, K.M.R., FIRMINO, F.P., CAMARGOS, L.R., MARODIN, N.B., PALUDO, G.R. Feline Leukemia virus: PCR as a diagnostic tool and hematological changes. In: AMERICAN SOCIETY OF VETERINARY CLINICAL PHATOLOGISTS (ASVCP) 35<sup>TH</sup> ANNUAL MEETINGS. Baltimore, Maryland. **Abstract**, n. 34, 30 october -03 november, 2010.
- 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 immunode.ciency virus (FIV). **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v9, p. 14-22, 2007.
- BAHARAK, A., ZIAALI, N., SHARIFI, H., REZAEI., SHIRIN, R. Feline immunodeficiency virus, feline leukemia virus and *Toxoplasma gondii* in strain and household cats in Kerman – Iran: Soroprevalence and correlation with clinical and laboratory findings. **Research in Veterinary Science**, v89, p. 306-310, 2010.
- BURG, J.A., GROVER, C.M., POULETTY, P., BOOTHROYD, J.C. Direct and sensitive of a pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii*, by polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v27, p. 1787-1792, 1989.
- CAXITO, F.A., COELHO, F.M., OLIVEIRA, M.E., RESENDE, M. Phylogenetic analysis of feline immunodeficiency vírus strains from state of Minas Gerais, Brazil. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v58, p.1222-1225, 2006.
- CLINKENBEARD, K.D., e MEINKOTH, J.H. In: **Schalm´s Veterinary Hematology**. 5<sup>a</sup> edição, Cap. 164, pg. 1064-1068, 2000.
- 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.
- FIRMINO, F.P., **Estudo da infecção por Hemoplasmas em felinos domésticos do Distrito Federal**. Brasília: UNB, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2010. 56 p. Dissertação (Mestrado em saúde animal).

- FUJINO, Y., HORIUCHI, H., MIZUKOSHI, F., BABA, K., GOTO-KOSHINO, Y., OHNO, K., TSUJIMOTO, H. Prevalence of hematological abnormalities and detection of infected bone marrow cells in asymptomatic cats with feline immunodeficiency virus infection. **Veterinary Microbiology**, v136, p.217–225, 2009.
- GLEICH, S., E 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, 2009.
- HAGIWARA, M.K. Anemia in Cats: Is It *Mycoplasma*?. WSAVA Congress, 2009. Disponible en: <http://www.vin.com/proceedings/Proceedings.plx?CID=WSAVA2009&Category=8064&PID=53524&Print=1&O=Generic>
- HAYWARD, J.J., RODRIGO, A.G. The distribution of feline immunodeficiency virus in tissue compartments of feral domestic cats. **Arch. Virol.** v155, p. 411-416, 2010.
- HELPER-HUNGERBUEHLER, A.K., CATTORI, V., BORETTI, F.S., OSSENT, P., GREY, P., REINACHER, M., HENRICH, M., BAUER, E., BAUER-PHAM, K., NIEDERER, E., HOLZNAGEL, E., LUTZ, H., HOFMANN-LEHMANN, R. Dominance of highly divergent feline leukemia virus A progeny variants in a cat with recurrent viremia and fatal lymphoma. **Retrovirology**, v7(14), p.1-17, 2010.
- HOHDATSU, 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.
- HUDSON, L.C., TOMPIKINS, M.B., MEEKER, R.B. Endothelial cell suppression of peripheral blood mononuclear cell trafficking in vitro during acute exposure to feline immunodeficiency virus. **Cell tissue Res**, v334, p. 55-65, 2008.
- JAIN, N.C. Essentials of Veterinary Hematology. Lea & Febiger: Philadelphia, 1993.
- KELLY, P.J., MOURA, L., MILLER, T., THURK, J., PERREAULT, N., WEIL, N., MAGGIO, R., LUCAS, H., BREITSCHWERDT, E. Feline immunodeficiency virus, feline leukemia virus and *Bartonella* species in stray cats on St Kitts, West Indies. **Journal of feline medicine and surgery**, v12, p.447-450, 2010.

- LARA, V. M., TANIWAKI, S. A., ARAÚJO, J. P., ARAÚJO JR. Occurrence of feline immunodeficiency virus infection in cats. **Ciência Rural**, v38, p.2245 -2249, 2008.
- LINENBERGER, M.L., SHELTON, G.H., PERSIK, M.T., ABKOWITZ, J.L. Hematopoiesis in Asymptomatic Cats Infected With Feline Immunodeficiency Virus. **Blood**, v:78, (8), p.1963-1968, 1991.
- LYONS, R.E., McLEOD, R., ROBERTS, C.W. *Toxoplasma gondii* tachyzoite – bradizoite interconversion. **Trends in parasitology**, v18, p. 198-201, 2002.
- 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 e Brazil. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v10, p.120-129, 2008.
- MARTINS, A.N., MEDEIROS, S.O., SIMONTTI, J.P., SCHATZMAYR, H.G., TANURI, A., BRINDEIRO, R.M. Phylogenetic and Genetic Analysis of Feline Immunodeficiency Virus *gag*, *pol*, and *env* Genes from Domestic Cats Undergoing Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor Treatment or Treatment-Naïve Cats in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Virology**, v82, p.7863-7874, 2008.
- MURPHY, F.A., GIBBS, E.P.J., HORZINEK, M.C., STUDDERT, M.J., Retroviridae. In: Veterinary Virology. 3<sup>a</sup>ed. San Diego: Academic Press, 1999. p. 363.
- OBERT, L. A. e HOOVER, E. A. Feline Immunodeficiency Virus Clade C Mucosal Transmission and Disease Courses. **Aids research and human retroviruses**, v16 (7), p.677–688, 2000.
- PECORARO, M.R., TAMANAGA, K., MYAZAWA, T., KAWAGUCHI, Y., SUGITA, S., TOHYA, Y., KAI, C., ETCHEVERRIGARAV, M.E., MIKAM, T. Genetic diversity of Argentine isolates of feline immunodeficiency virus. **V77**, p.2031-2035, 1996.
- PECON-SLATTERY, J., MCCRACKEN, C. L., TROYER, J. L., VANDEWOUDE, S., ROELKE, M., SONDGEROTH, K., WINTERBACH, C., WINTERBACH, H., O'BRIEN, J. S.Genomic organization, sequence divergence, and recombination of feline immunodeficiency virus from lions in the wild. **BMC Genomics**, v9:(66), p.1-13, 2008.

- PISTELLO, M., CAMMAROTA, G., NICOLETTI, E., METTEUCI., D., CURCIO, M., DEL MAURO, D., BENDINELLI, M. Analysis of the genetic diversity and phylogenetic relationship of Italian isolates of feline immunodeficiency virus indicates a high prevalence and heterogeneity of subtype B. **Journal of general virology**, v78, p. 2247-2257, 1997.
- SIEBELINK, K.H.J., CHU, I., RIMMELZWAAN, G.F., WEIJER, K., HERWIJNEN, R.V., KNELL, P., EGBERINK, H.F., BOSCH, M.L., OSTERHAUS A.D.M.L. Feline Immunodeficiency Virus (FIV) Infection in the Cat as a Model for HIV Infection in Man: FIV-Induced Impairment of Immune Function. **Aids research and human retroviruses**, v6(12), p.1373-1378, 1990.
- TASKER, S. Haemotropic mycoplasmas – What’s their real significance in cats. **Journal of feline medicine and surgery**, v12, p. 369-381, 2010.
- TEIXEIRA, B.M., LOGAN, N., CRUZ, J.C.M., REIS, J.K.P., BRANDÃO, P.E., RICHTZENHAIN, L.J., HAGIWARA, M.K., WILLETT, B.J., HOSIE, M.J. Genetic diversity of Brazilian isolates of feline immunodeficiency virus. v155, p.379–384, 2010.
- VEIR, J.K. E LAPPIN, M.R. Molecular diagnostic assays for infectious diseases in cats. **Vet Clin Small Anim.** v40, p.1189–1200, 2010.
- YAMAMOTO, J.K., PUA, R., SATOA, E. HOHDATSUB, T. Feline immunodeficiency virus pathogenesis and development of a dual-subtype feline immunodeficiency-virus vaccine. **AIDS**, v21, p.547-563, 2007.

## **CAPITULO III**

### **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

O vírus da imunodeficiência felina ainda é pouco distribuído dentro das populações existentes no Distrito Federal. Nas populações estudadas as taxas de ocorrência são bem baixas para a população mundial, sendo que a ocorrência total na população foi de 2%. Uma avaliação epidemiológica em maior proporção poderia demonstrar a frequência do vírus na população, em conjunto com as reais alterações hematológicas e fatores de risco entre as co-infecções com o retrovírus, bem como avaliações teciduais para verificar possíveis compartimentalizações.

São comuns as co-infecções entre FIV, FeIV e hemoplasma, o que limita ainda mais um estudo comparativo hematológico, onde exista somente a infecção pelo FIV. No estudo não houve a possibilidade de diferenciação de padrões hematológicos devido a todos animais possuírem a maioria das co-infecções, e também devido ao pequeno número de animais infectados. Assim, os animais infectados bem como os não infectados apresentavam médias dentro do padrão e em sua maioria sem alterações estatísticas.

A co-infecção por *Toxoplasma gondii* não foi observada, porém o uso de outras técnicas diagnósticas para este protozoário seria necessário, já que é sugerido que a co-infecção entre os agentes pode levar danos na saúde humana.

Sugere-se a existência de um subtipo viral heterogêneo dentro da população estudada, o que pode evidenciar um novo subtipo na população do Brasil. Estabelecer padrões geográficos filogenéticos do FIV, em conjunto com as alterações hematológicas, clínicas e padrões de transmissão, bem como alterações mutacionais na população de FIV brasileira, são necessárias para melhor elaboração de medidas preventivas e diagnósticas.

## ANEXO

I – Tabela de hemogramas de todos animais testados.

Local	Grp	VG	HM	HB	PPT	LEU	MONOABS	LINFABS	EOSABS	SEGABS	BASABS	BASTABS	PLAQUETAS	VCM	CHCM	ALBUMINA	PROTEINA	GLOBULINA
HV	G2	18	3.16	5.90	9.00	5200	104	312	0	4784	0	0	100000	56.96	32.78	.	.	.
HV	G2	19	2.94	4.90	8.00	4900	11	32	4	53	0	0	150000	64.63	25.79	.	.	.
GT	G2	36	8.33	15.10	8.80	9700	194	1261	485	7760	0	0	442000	43.22	41.94	7.70	1.89	5.81
GT	G2	33	7.68	13.00	7.60	8800	0	4400	352	3960	0	0	470000	42.97	39.39	8.30	2.09	6.21
HV	G1	14	3.42	4.80	6.20	15300	612	3213	459	11016	0	0	626000	40.94	34.29	.	.	.
HV	G1	12	1.97	3.90	8.40	10900	654	4578	0	5559	0	109	250000	60.91	32.50	.	.	.
HV	G1	9	1.90	3.00	7.80	11700	117	2691	1521	6318	0	0	320000	47.37	33.33	.	.	.
HV	G1	7	1.54	2.20	5.20	10600	0	7738	424	2226	0	106	17500	45.45	31.43	.	.	.
HV	G1	8	2.01	2.80	8.00	5900	236	2655	0	2891	0	118	157000	39.80	35.00	.	.	.
HV	G1	25	6.18	9.00	6.20	5200	884	2080	52	1872	0	0	120000	40.45	36.00	.	.	.
HV	G1	8	1.37	2.30	7.20	15000	0	3450	150	11400	0	0	320000	58.39	28.75	.	.	.
HV	G1	29	6.67	10.10	6.20	7000	140	2870	420	3570	0	0	275000	43.48	34.83	.	.	.
HV	G1	12	3.07	3.90	8.20	32700	0	327	327	32046	0	0	620000	39.09	32.50	.	.	.
HV	G1	18	4.06	5.80	6.20	12200	480	976	610	10126	0	0	400000	44.33	32.22	.	.	.
HV	G1	13	3.21	4.30	7.00	3560	99	330	141	2990	0	0	210000	40.50	33.08	.	.	.
HV	G1	9	2.32	3.00	9.00	27300	546	273	0	26481	0	0	500000	38.79	33.33	.	.	.
HV	G1	10	1.40	3.20	7.80	7900	170	5610	340	10710	0	170	20000	71.43	32.00	.	.	.
HV	G1	20	5.01	7.20	7.00	14900	447	3576	0	10877	0	0	.	39.92	36.00	.	.	.
HV	G1	34	8.49	11.80	6.40	4600	46	966	276	3312	0	0	360000	40.05	34.71	.	.	.
HV	G1	34	8.90	12.00	6.40	4900	49	1372	98	3283	98	0	280000	38.20	35.29	.	.	.
HV	G1	18	6.51	5.40	6.00	12600	444	2664	0	11544	0	148	20000	27.65	30.00	.	.	.
HV	G1	19	3.92	5.90	5.60	21600	216	2160	864	18360	0	0	452000	48.47	31.05	.	.	.
HV	G1	20	5.79	7.20	6.00	11200	0	3024	1792	6272	112	0	365000	34.54	36.00	.	.	.
HV	G1	10	2.77	3.10	5.20	5400	324	108	0	4968	0	0	15000	36.10	31.00	.	.	.
HV	G1	31	7.36	10.00	8.60	7700	154	462	0	7084	0	0	.	42.12	32.26	.	.	.
HV	G1	38	9.68	12.50	8.00	4400	88	2596	748	968	0	0	.	39.26	32.89	.	.	.
HV	G1	33	8.88	11.80	6.80	9400	0	376	752	8272	0	0	296000	37.16	35.76	.	.	.
HV	G1	23	5.97	7.90	7.80	1600	64	560	0	640	0	336	25000	38.53	34.35	.	.	.
HV	G1	30	7.51	10.30	5.80	10400	0	832	0	9568	0	0	400000	39.95	34.33	.	.	.
HV	G1	29	8.00	10.00	6.40	16700	0	4509	4008	8016	167	0	270000	36.25	34.48	.	.	.
HV	G1	33	7.90	10.20	5.80	5100	51	2142	612	2193	102	0	610000	41.77	30.91	.	.	.

HV	G1	31	7.60	10.90	7.20	7000	140	1260	140	5460	0	0	255000	40.79	35.16	.	.	.
HV	G1	32	8.25	11.50	5.60	8500	85	2805	255	5355	0	0	360000	38.79	35.94	.	.	.
HV	G1	29	7.02	10.00	6.60	9500	475	2660	1615	4750	0	0	740000	41.31	34.48	.	.	.
HV	G1	27	6.85	9.20	6.80	5600	112	1512	168	3752	56	0	285000	39.42	34.07	.	.	.
HV	G1	8	1.21	2.60	5.40	8600	172	2150	0	5762	0	516	20000	66.12	32.50	.	.	.
HV	G1	16	2.23	5.50	7.00	9200	92	828	0	7820	0	460	20000	71.75	34.38	.	.	.
HV	G1	36	8.53	12.40	7.00	5700	0	1083	285	4332	0	0	325000	42.20	34.44	.	.	.
HV	G1	40	9.68	13.60	7.00	6600	198	660	264	5478	0	0	415000	41.32	34.00	.	.	.
HV	G1	12	2.91	4.10	5.40	12000	240	960	360	10320	0	0	315000	41.24	34.17	.	.	.
HV	G1	33	7.29	11.30	6.60	15800	316	790	1264	13430	0	0	330000	45.27	34.24	.	.	.
HV	G1	39	8.55	12.80	7.00	7000	140	1680	0	5180	0	0	805000	45.61	32.82	.	.	.
HV	G1	37	5.95	12.30	6.80	8050	242	2335	161	5313	0	0	400000	62.18	33.24	.	.	.
HV	G1	32	7.65	11.50	6.40	4600	92	1380	322	2806	0	0	350000	41.83	35.94	.	.	.
HV	G1	31	7.73	11.00	6.00	16200	1134	5022	324	9072	0	162	355000	40.10	35.48	.	.	.
HV	G1	32	8.53	11.50	6.20	9800	0	2744	490	6468	0	98	255000	37.51	35.94	.	.	.
HV	G1	39	10.00	14.00	6.60	5500	0	1815	275	3410	0	0	455000	39.00	35.90	.	.	.
HV	G1	33	7.29	11.30	6.60	15800	316	790	1264	13430	0	0	500000	45.27	34.24	.	.	.
HV	G1	37	9.90	13.00	6.60	5500	0	1815	275	3410	0	0	455000	37.37	35.14	.	.	.
HV	G1	34	6.50	12.10	6.40	4800	48	1008	240	3456	48	0	270000	52.31	35.59	.	.	.
HV	G1	20	6.70	6.60	5.00	7100	284	0	71	6745	0	0	95000	29.85	33.00	.	.	.
HV	G1	22	5.80	7.20	7.00	7000	140	1680	0	5180	0	0	805000	37.93	32.73	.	.	.
HV	G1	36	7.93	12.60	6.40	3800	38	228	304	3230	0	0	160000	45.40	35.00	.	.	.
HV	G1	14	2.78	5.20	6.80	9700	679	1843	0	6693	0	485	156000	50.36	37.14	.	.	.
HV	G1	13	2.28	3.80	6.80	11800	826	4248	0	6726	0	0	199000	57.02	29.23	.	.	.
HV	G1	45	4.16	14.20	6.40	6600	264	1914	264	4158	0	0	463000	108.17	31.56	.	.	.
HV	G1	29	5.19	8.40	8.00	6400	0	2880	512	2944	0	64	171000	55.88	28.97	.	.	.
HV	G1	39	10.04	14.00	7.00	5100	51	663	765	3621	0	0	220000	38.84	35.90	.	.	.
HV	G1	38	9.63	13.40	6.20	4400	132	1364	88	2816	0	0	255000	39.46	35.26	.	.	.
HV	G1	35	8.20	12.50	6.40	15300	153	8721	918	5508	0	0	265000	42.68	35.71	.	.	.
HV	G1	33	6.26	10.20	6.90	4800	0	1104	432	3264	0	0	356000	52.72	30.91	.	.	.
HV	G1	11	2.74	3.50	5.00	16600	3984	2158	0	9628	0	664	232000	40.15	31.82	.	.	.
HV	G1	30	6.00	10.00	6.00	6	0	2299	0.363	30855	0	0	.	50.00	33.33	.	.	.
HV	G1	28	5.60	9.30	6.40	10	0	3383	0.4975	56715	0	0	.	50.00	33.21	.	.	.
HV	G1	30	6.60	9.90	7.00	18400	368	7544	552	7544	0	0	351000	45.45	33.00	.	.	.
HV	G1	31	6.37	10.20	6.60	18000	1260	2700	0	14040	0	0	309000	48.67	32.90	.	.	.
HV	G1	28	8.00	10.00	7.20	13000	390	5330	650	6630	0	0	200000	35.00	35.71	.	.	.
HV	G1	4	1.00	2.50	7.40	9500	1045	2850	95	3230	0	380	66000	40.00	62.50	.	.	.
HV	G1	35	9.14	13.30	6.80	3000	0	180	0	2640	0	180	222500	38.29	38.00	.	.	.
HV	G1	30	8.39	11.50	7.20	6900	207	1794	690	4209	0	0	255000	35.76	38.33	.	.	.

HV	G1	24	4.80	8.00	5.20	16700	0	9352	334	7014	0	0	80000	50.00	33.33	.	.	.
HV	G1	37	6.82	10.00	4.60	4200	84	2478	210	1428	0	0	119000	54.25	27.03	.	.	.
HV	G1	23	5.20	6.40	6.20	30000	900	900	300	27900	0	0	440000	44.23	27.83	.	.	.
HV	G1	44	9.83	14.90	8.20	6700	603	1139	268	4690	0	0	232000	44.76	33.86	.	.	.
HV	G1	27	4.52	7.40	5.60	18100	362	905	362	14661	0	0	368000	59.73	27.41	.	.	.
HV	G1	53	10.95	16.50	7.20	16500	825	6930	825	7920	0	0	262000	48.40	31.13	.	.	.
FC	G1	26	6.80	9.30	6.60	21000	420	1680	2520	16380	0	0	375000	38.24	35.77	7.10	1.82	5.28
FC	G1	28	6.99	10.30	7.20	8800	440	2200	528	5632	0	0	285000	40.06	36.79	6.80	1.38	5.42
FC	G1	27	7.89	10.70	8.00	26800	1340	2680	1072	21708	0	0	100000	34.22	39.63	6.40	2.03	4.37
FC	G1	40	9.95	12.80	8.20	17000	850	1360	1020	13600	0	170	225000	40.20	32.00	8.60	2.21	6.39
FC	G1	35	9.15	12.60	8.00	15000	300	1500	150	13050	0	0	185000	38.25	36.00	8.40	2.58	5.82
FC	G1	28	8.02	10.50	8.00	26700	267	1335	1068	24030	0	0	255000	34.91	37.50	8.30	2.20	6.10
FC	G1	29	7.78	10.50	7.00	13800	552	1794	966	10488	0	0	275000	37.28	36.21	9.50	2.23	7.27
FC	G1	26	7.22	9.90	7.80	21600	432	2808	3240	15120	0	0	475000	36.01	38.08	7.10	1.82	5.28
FC	G1	34	9.13	12.30	6.80	17400	0	2088	1218	14094	0	0	285000	37.24	36.18	7.20	3.49	3.71
FC	G1	38	9.95	13.50	6.60	12000	360	3840	840	6960	0	0	230000	38.19	35.53	.	.	.
FC	G1	26	6.46	9.50	6.80	6600	66	3036	858	2640	0	0	445000	40.25	36.54	7.70	1.65	6.05
FC	G1	22	5.59	7.70	6.40	19100	382	7831	1910	8977	0	0	155000	39.36	35.00	7.90	1.77	6.13
FC	G1	27	6.42	9.30	6.00	7900	158	2054	948	4740	0	0	420000	42.06	34.44	6.40	0.81	5.59
FC	G1	26	7.10	11.40	7.20	10000	0	2300	2000	5700	0	0	.	36.62	43.85	7.70	1.93	5.77
FC	G1	22	6.20	10.40	7.00	10200	204	2346	510	6732	0	0	335000	35.48	47.27	6.60	1.47	5.13
FC	G1	37	11.26	13.90	7.00	15600	312	4212	936	10296	0	0	.	32.86	37.57	7.40	1.57	5.83
FC	G1	26	7.12	9.20	5.80	11000	220	4070	990	5720	0	0	410000	36.52	35.38	6.90	2.18	4.72
FC	G1	30	9.43	11.10	7.20	15400	616	3388	616	10780	0	0	415000	31.81	37.00	6.40	1.33	5.07
FC	G1	33	9.07	14.10	8.00	26700	534	7743	4272	14151	0	0	155000	36.38	42.73	7.70	1.63	6.07
FC	G1	31	8.13	11.40	7.60	11600	0	4640	2088	4872	0	0	115000	38.13	36.77	.	.	.
FC	G1	37	9.62	13.80	7.00	8700	174	3567	1131	3828	0	0	305000	38.46	37.30	5.90	1.37	4.53
FC	G1	31	8.35	12.20	7.00	7500	750	3750	525	2475	0	0	130000	37.13	39.35	8.70	2.80	5.90
FC	G1	15	4.49	6.60	6.00	6400	0	2816	1152	2432	0	0	397000	33.41	44.00	5.90	3.40	2.50
FC	G1	30	7.64	11.90	6.00	7200	216	3024	432	3528	0	0	370000	39.27	39.67	8.40	2.45	5.95
FC	G1	38	9.95	14.00	7.00	15800	316	4898	3002	7584	0	0	800000	38.19	36.84	8.50	2.18	6.32
FC	G1	29	7.63	10.70	6.20	6500	0	2600	780	3120	0	0	240000	38.01	36.90	7.80	1.91	5.89
FC	G1	28	6.18	11.10	6.40	34000	1360	10200	1020	21420	0	0	250000	45.31	39.64	7.30	2.17	5.13
FC	G1	38	9.25	14.80	6.80	16600	0	5810	2822	7968	0	0	160000	41.08	38.95	.	.	.
FC	G1	31	10.15	14.70	.	11000	0	3740	550	6600	0	0	20000	30.54	47.42	7.80	1.88	5.92
FC	G1	37	9.12	12.50	.	13300	133	6251	2527	4389	0	133	.	40.57	33.78	6.80	2.00	4.80
FC	G1	36	7.15	12.00	.	23400	234	7020	1404	14742	0	0	595000	50.35	33.33	8.10	2.23	5.87
FC	G1	36	10.15	12.00	.	13600	136	5848	1088	6528	0	0	.	35.47	33.33	.	.	.
FC	G1	33	8.42	13.30	7.00	15000	600	4350	1500	8550	0	0	365000	39.19	40.30	9.00	2.19	6.81

FC	G1	37	9.13	13.70	5.80	14400	144	720	1728	5040	0	0	475000	40.53	37.03	7.40	2.52	4.88
FC	G1	34	8.44	13.00	7.20	14700	588	1470	3087	9408	0	147	395000	40.28	38.24	8.30	1.97	6.33
FC	G1	23	7.42	10.60	5.80	20000	1200	3600	4400	10800	0	0	500000	31.00	46.09	6.50	2.00	4.50
FC	G1	24	6.18	8.00	7.20	24100	2410	3133	1687	16870	0	0	.	38.83	33.33	10.10	2.00	8.10
FC	G1	37	9.65	15.40	6.80	17400	1740	5568	3654	6438	0	0	425000	38.34	41.62	7.00	1.93	5.07
FC	G1	30	8.24	12.20	7.00	10300	412	2678	2472	4738	0	0	555000	36.41	40.67	9.00	1.98	7.02
FC	G1	21	6.79	11.20	6.40	9500	475	2660	1615	4750	0	0	460000	30.93	53.33	7.40	1.81	5.59
FC	G1	39	10.57	15.40	7.80	13200	396	924	132	11748	0	0	590000	36.90	39.49	9.80	2.37	7.43
FC	G1	29	8.11	10.50	6.80	14200	426	2982	426	10366	0	0	305000	35.76	36.21	8.20	2.42	5.78
FC	G1	27	6.29	10.40	7.00	7700	231	3388	616	3465	0	0	360000	42.93	38.52	8.30	1.83	6.47
FC	G1	27	7.33	10.20	7.40	9500	285	4560	285	4370	0	0	470000	36.83	37.78	7.80	2.12	5.68
FC	G1	26	6.74	9.80	6.00	12700	127	3556	635	8382	0	0	295000	38.58	37.69	9.80	2.27	7.53
FC	G1	30	8.08	13.10	7.80	5800	58	3016	928	1798	0	0	380000	37.13	43.67	8.40	2.09	6.31
FC	G1	38	7.20	13.60	6.80	8300	415	2822	249	4814	0	0	560000	52.78	35.79	8.30	2.12	6.18
FC	G1	32	8.60	13.50	8.00	10300	412	2472	1133	5871	0	412	310000	37.21	42.19	8.90	2.22	6.68
FC	G1	33	8.87	13.00	8.60	12400	620	3224	1116	7316	0	124	460000	37.20	39.39	7.20	1.41	5.79
FC	G1	34	9.28	14.70	7.40	5800	290	1160	1044	3248	0	58	255000	36.64	43.24	8.60	2.29	6.31
FC	G1	44	12.54	16.90	8.40	9800	294	3528	1764	4116	0	98	290000	35.09	38.41	8.40	2.27	6.13
FC	G1	33	8.58	12.70	7.20	16000	800	4480	480	10080	0	160	165000	38.46	38.48	7.70	2.60	5.10
FC	G1	37	9.82	13.90	7.00	8400	336	3696	840	3444	84	0	390000	37.68	37.57	7.90	1.95	5.95
FC	G1	28	7.79	12.50	8.00	13900	0	6116	973	6811	0	0	240000	35.94	44.64	8.20	2.37	5.83
FC	G1	25	7.45	10.60	7.40	10400	208	5720	1040	3224	208	0	270000	33.56	42.40	10.40	3.43	6.97
FC	G1	23	6.61	10.30	7.40	11500	0	5060	805	5635	0	0	315000	34.80	44.78	8.40	2.36	6.04
FC	G1	29	7.24	10.20	7.40	10500	210	5775	1050	3255	210	0	195000	40.06	35.17	7.90	1.69	6.21
FC	G1	26	6.14	9.30	6.60	17400	522	5916	2784	8178	0	0	380000	42.35	35.77	7.70	2.11	5.59
FC	G1	27	7.06	10.30	6.00	10800	108	3456	756	6480	0	0	335000	38.24	38.15	7.80	2.11	5.69
FC	G1	31	7.82	11.90	7.00	11000	110	2640	330	7810	0	110	310000	39.64	38.39	7.60	2.63	4.97
FC	G1	27	7.11	9.80	6.00	14100	423	4089	3384	6204	0	0	485000	37.97	36.30	7.40	3.05	4.35
FC	G1	26	7.08	8.10	5.80	10700	642	3317	963	5671	0	107	290000	36.72	31.15	6.90	1.89	5.01
FC	G1	37	10.03	13.50	7.40	12500	375	4125	875	7125	0	0	290000	36.89	36.49	5.70	1.86	3.84
FC	G1	32	8.87	12.00	7.00	15600	156	9204	780	5460	0	0	100000	36.08	37.50	7.50	2.43	5.07
FC	G1	27	6.64	9.30	7.20	10000	300	2700	200	6700	0	100	685000	40.66	34.44	5.70	1.91	3.79
FC	G1	28	7.43	11.00	6.80	12500	375	2875	1375	7875	0	0	350000	37.69	39.29	8.10	2.56	5.54
FC	G1	27	6.83	10.80	7.60	6600	66	2112	330	4092	0	0	440000	39.53	40.00	6.60	2.65	3.95
FC	G1	37	9.14	12.60	6.20	38400	0	16512	4224	17280	384	0	149000	40.48	34.05	6.30	2.33	3.97
FC	G1	20	5.72	7.90	6.40	20300	1218	3451	2639	11571	0	1421	246000	34.97	39.50	6.70	2.45	4.25
FC	G1	20	4.87	7.80	6.40	21700	1736	3255	868	15407	217	217	134000	41.07	39.00	7.10	2.52	4.58
FC	G1	33	10.01	13.70	7.40	14000	140	6020	2520	5320	0	0	453000	32.97	41.52	6.20	2.19	4.01
FC	G1	35	9.05	4.40	8.20	4000	40	1040	320	2520	40	40	214000	38.67	12.57	5.80	1.68	4.12

FC	G1	28	9.32	14.10	7.00	16100	0	322	1288	12880	0	0	423000	30.04	50.36	8.20	1.95	6.25
FC	G1	25	15.60	17.90	8.20	7800	0	1404	624	5772	0	0	601000	16.03	71.60	6.50	1.73	4.77
FC	G1	25	6.39	11.30	6.80	33100	662	10923	3641	17874	0	0	206000	39.12	45.20	.	.	.
FC	G1	26	5.20	8.60	6.60	23600	0	9676	2124	11800	0	0	155000	50.00	33.08	7.90	1.66	6.24
FC	G1	33	9.16	14.00	8.00	16300	0	7335	1141	7824	0	0	770000	36.03	42.42	5.60	1.77	3.83
FC	G1	24	6.61	9.80	6.00	10500	105	2310	2205	5880	0	0	345000	36.31	40.83	5.60	2.18	3.42
FC	G1	28	7.50	13.60	8.20	22700	227	8626	2497	11350	0	0	174000	37.33	48.57	7.30	2.06	5.24
FC	G1	33	9.97	14.90	8.00	16700	501	3674	1503	11022	0	0	486000	33.10	45.15	6.50	2.92	3.58
FC	G1	26	7.77	11.00	6.40	13000	0	3510	650	8840	0	0	611000	33.46	42.31	.	.	.
FC	G1	26	6.74	10.30	6.60	9800	294	1960	490	6958	98	0	725000	38.58	39.62	4.80	2.18	2.62
FC	G1	31	8.87	13.60	7.80	15500	155	5735	2015	7595	0	0	300000	34.95	43.87	7.30	2.66	4.64
FC	G1	35	8.05	17.50	8.60	18900	189	9639	1890	7182	0	0	290000	43.48	50.00	8.10	1.60	6.50
GT	G1	45	9.96	15.80	9.60	27500	0	11825	1100	14575	0	0	171000	45.18	35.11	9.2	1.81	7.39
GT	G1	44	10.69	15.70	8.20	23600	0	13924	1652	8024	0	0	252000	41.16	35.68	8.2	1.86	6.34
GT	G1	38	10.31	14.30	9.00	28600	0	10582	3718	14300	0	0	360000	36.86	37.63	8.7	1.9	6.80
GT	G1	32	9.91	14.90	9.20	13400	134	2546	402	10318	0	0	624000	32.29	46.56	7.8	1.63	6.17
GT	G1	37	8.78	13.70	7.80	26700	1068	3471	1869	20292	0	0	184000	42.14	37.03	7.1	1.87	5.23
GT	G1	40	11.66	14.70	8.20	22200	0	10656	2886	8658	0	0	652000	34.31	36.75	7.6	1.88	5.72
GT	G1	37	9.30	16.10	9.20	15400	308	5544	2310	7238	0	0	396000	39.78	43.51	8.8	1.78	7.02
GT	G1	22	6.49	10.60	11.20	24300	0	4374	1701	18225	0	0	216000	33.90	48.18	9.5	1.26	8.24
GT	G1	29	8.26	12.40	9.20	27300	273	7371	6279	13377	0	0	228000	35.11	42.76	9.6	1.57	8.03
GT	G1	32	8.08	12.60	8.40	20400	204	3876	612	15708	0	0	202000	39.60	39.38	8.1	1.36	6.74
GT	G1	28	6.71	11.50	8.00	23500	0	940	470	22090	0	0	441000	41.73	41.07	7.1	1.39	5.71
GT	G1	33	7.82	11.90	8.20	31500	315	5040	1575	24570	0	0	238000	42.20	36.06	7.9	0.93	6.97
GT	G1	34	8.87	15.60	8.20	18900	189	4536	2646	11529	0	0	451000	38.33	45.88	8.5	1.3	7.20
GT	G1	33	6.27	11.50	7.80	11000	0	2970	550	7480	0	0	246000	52.63	34.85	7.8	1.36	6.44
GT	G1	30	12.25	10.00	7.20	10600	0	4028	954	5618	0	0	180000	24.49	33.33	7.4	2.15	5.25
GT	G1	27	6.38	10.40	8.80	21800	872	4142	2180	14388	0	218	164000	42.32	38.52	9.3	1.47	7.83
GT	G1	27	6.78	10.50	9.80	42500	425	4675	0	37400	0	0	280000	39.82	38.89	9.7	1.55	8.15
GT	G1	35	9.81	14.40	8.00	9000	0	1440	540	7020	0	0	454000	35.68	41.14	8.2	2.04	6.16
GT	G1	33	7.23	11.70	9.00	23500	470	4230	705	18095	0	0	395000	45.64	35.45	8.4	1.65	6.75
GT	G1	27	8.25	12.30	8.40	33600	0	3024	2016	28560	0	0	396000	32.73	45.56	9.8	1.47	8.33
GT	G1	29	7.95	9.60	8.00	16000	160	4640	2560	8640	0	0	325000	36.48	33.10	7.00	1.82	5.18
GT	G1	28	11.50	19.40	9.20	21100	211	5908	1899	1266	0	211	319000	24.35	69.29	5.4	1.53	3.87
GT	G1	27	7.19	10.10	7.80	18000	900	2700	2520	11880	0	0	515000	37.55	37.41	8.1	1.59	6.51
GT	G1	40	9.22	14.70	7.60	25900	0	6216	777	18648	259	0	267000	43.38	36.75	8.00	2.18	5.82
GT	G1	38	11.73	17.80	8.40	8410	252	2691	1262	4121	84	0	426000	32.40	46.84	8.7	2.72	5.98
GT	G1	38	9.92	13.80	7.20	13700	411	2466	959	9727	137	0	393000	38.31	36.32	7.6	1.57	6.03
GT	G1	30	7.82	11.90	7.60	21200	424	2756	2756	15264	0	0	310000	38.36	39.67	8.6	1.35	7.25

GT	G1	37	11.70	15.60	8.40	21200	0	8904	1272	10600	424	0	334000	31.62	42.16	8.3	1.77	6.53
GT	G1	34	7.70	11.70	7.40	34400	0	3096	2408	28896	0	0	267000	44.16	34.41	7.00	1.87	5.13
GT	G1	35	9.96	15.60	7.60	12100	0	4598	1694	5808	0	0	411000	35.14	44.57	7.2	2.12	5.08
GT	G1	26	6.14	8.70	8.20	18100	181	3801	1448	12308	362	0	281000	42.35	33.46	8.1	1.72	6.38
GT	G1	39	11.71	16.30	8.00	16700	0	7849	1503	7348	0	0	433000	33.30	41.79	7.6	2.4	5.20
GT	G1	39	10.75	15.50	8.00	34300	0	6860	6517	20923	0	0	442000	36.28	39.74	8.4	2.06	6.34
GT	G1	34	7.26	11.90	8.80	36400	1456	2912	3640	28392	0	0	403000	46.83	35.00	7.4	1.5	5.90
GT	G1	27	6.99	10.00	9.00	41300	413	9499	5369	25606	413	0	395000	38.63	37.04	9.1	1.38	7.72
GT	G1	28	9.55	11.00	9.00	51800	518	6216	7252	37814	0	0	435000	29.32	39.29	8.4	1.97	6.43
GT	G1	35	9.40	14.20	7.40	17300	0	2249	1038	14013	0	0	369000	37.23	40.57	7.2	1.9	5.30
GT	G1	27	11.38	17.50	9.20	16800	168	3528	1848	11256	0	0	262000	23.73	64.81	8.3	1.79	6.51
GT	G1	28	7.13	11.20	7.20	34000	680	20400	1700	11220	0	0	255000	39.27	40.00	7.2	1.46	5.74
GT	G1	37	9.65	12.30	7.80	21500	0	2795	3870	14835	0	0	400000	38.34	33.24	7.1	1.79	5.31

Local - HV: Hospital Veterinário; FC: Fercal; GT: Abrigo de animais. GrP: Grupo - G1 negativos; G2: positivos. VG: Volume Globular. HM: Contagem de hemácias. HB: Hemoglobina. PPT: Proteínas Plasmáticas Totais. LEU: Contagem total de leucócitos. MONOABS: Contagem absoluta de monócitos. LINFABS: Contagem absoluta de linfócitos. EOSABS: Contagem absoluta de eosinófilos. SEGABS: Contagem absoluta de segmentados. BASABS: Contagem absoluta de basófilos. BASTABS: Contagem absoluta de bastonetes. VCM: Volume corpuscular médio. CHCM: Concentração de hemoglobina corpuscular média