

Anselmo Vasconcelos Rivetti Júnior

**RETROVIROSES, *Toxoplasma gondii* e *Mycoplasma haemofelis* EM
GATOS ERRANTES E FELINOS SELVAGENS DO ZOOLOGICO DE
BELO HORIZONTE-MG**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Veterinária.

Área de Concentração: Medicina Veterinária Preventiva.

Orientador: Prof. Mauricio Resende

Co-orientadora: Prof^a. Zélia Inês Portela Lobato

**Belo Horizonte
Escola de Veterinária - UFMG
2006**

R624r Rivetti Júnior, Anselmo Vasconcelos, 1981-
Retrovíroses, toxoplasma gondii e Mycoplasma haemofelis em gatos errantes e felinos selvagens do Zoológico de Belo Horizonte-MG / Anselmo Vasconcelos Rivetti Júnior. – 2006.
38 p. : il.

Orientador: Mauricio Rezende
Co-orientador: Zélia Inês Portela Lobato
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária
Inclui bibliografia

1. Gato – Doenças – Teses. 2. Animais selvagens – Doenças – Teses. 3. Vírus da imunodeficiência em felino – Teses. 4. Toxoplasmose em animais – Teses. 5. Micoplasmose em animais – Teses. I. Rezende, Mauricio. II. Lobato, Zélia Inês Portela. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. IV. Título.

CDD – 636.808 96

Aos professores, colegas e funcionários
do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva
que contribuíram e possibilitaram a realização deste trabalho.

À minha querida mãe
pelo seu eterno exemplo.

À Prof^a. Zélia Lobato
pelos seus ensinamentos.

Ao Prof. Mauricio Resende
e aos colegas e funcionários do
Laboratório de Virologia Comparada-ICB.

“Não podemos encontrar álibis externos para a nossa atuação. Não ignoro o Estado, os políticos ou os sindicatos. Mas não acredito em nenhuma solução que não comece comigo. Não é Deus nem o Diabo. Somos nós que temos que fazer.” (Herbert de Souza – “Betinho”)

SUMÁRIO

	LISTA DE ABREVIATURAS	08
	LISTA DE TABELAS	09
	LISTA DE FIGURAS	09
	RESUMO	10
	ABSTRACT	10
1.	INTRODUÇÃO	11
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
2.1	Vírus da Imunodeficiência Felina	11
2.1.1	Subtipos virais	12
2.1.2	Transmissão	12
2.1.3	Epidemiologia	12
2.1.3.1	<i>Felis catus</i>	12
2.1.3.2	Lentivírus nos felinos selvagens	13
2.1.4	Diagnóstico.....	13
2.2	Vírus da Leucemia Felina	13
2.2.1	Subtipos virais	14
2.2.2	Transmissão	14
2.2.3	Epidemiologia	14
	<i>Felis catus</i>	14
2.2.3.1	FeLV nos felinos selvagens	15
2.2.4	Diagnóstico.....	15
2.3	<i>Toxoplasma gondii</i>	15
2.3.1	Transmissão	15
2.3.2	Epidemiologia	16
2.3.3	Diagnóstico.....	16
2.4	<i>Mycoplasma haemofelis</i>	16
2.4.1	Transmissão	17
2.4.2	Diagnóstico.....	17
3.	OBJETIVOS	17
3.1	Objetivos gerais	17
3.2	Objetivos específicos	17
4.	MATERIAL E MÉTODOS	17
4.1	Animais avaliados	17
4.2	Captura e contenção dos felinos	18
4.3	Avaliação clínica dos felinos	18
4.4	Identificação dos felinos	18
4.5	Coleta das amostras clínicas	19
4.6	Diagnóstico para o FIV	19
4.6.1	Métodos sorológicos indiretos.....	19
4.6.1.1	Produção de células persistentemente infectadas.....	19
4.6.1.2	Células.....	19

4.6.1.3	Inoculação do vírus de referência (FIV-Petaluma) no cultivo de CrFK.....	19
4.6.1.4	Fixação da monocamada infectada de CrFK.....	19
4.6.1.5	Métodos de bloqueio	19
4.6.1.6	Obtenção de controles positivos e negativos para o FIV.....	19
4.6.1.6.1	Controle positivo.....	19
4.6.1.6.2	Controle negativo	20
4.6.1.7	Produção de conjugados anti-IgG felino	20
4.6.1.7.1	Conjugado anti-IgG felino / isotiocianato de fluoresceína.....	20
4.6.1.7.2	Conjugado anti-IgG felino / peroxidase	20
4.6.1.8	RIFI para o FIV	20
4.6.1.9	Imunoperoxidase em monocamada celular para o FIV	21
4.6.2	<i>Nested</i> PCR para o FIV.....	21
4.7	Pesquisa direta para o <i>Mycoplasma haemofelis</i>	21
4.8	RIFI para <i>Toxoplasma gondii</i>	21
4.8.1	Preparação dos taquizoítos.....	21
4.8.2	Testes dos soros	21
4.9	<i>Nested</i> PCR para o FeLV	21
4.10	Hemogramas.....	21
4.11	Análise estatística	21
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	21
5.1	Ocorrência do FIV, FeLV, <i>Mycoplasma haemofelis</i> e <i>Toxoplasma gondii</i>...21	21
5.1.1	Ocorrência do FIV	23
5.1.1.1	Relação entre a detecção do FIV - sinais clínicos e hematológicos.....	23
5.1.2	Ocorrência do FeLV	24
5.1.2.1	Relação entre a detecção do FeLV - sinais clínicos e hematológicos.....	25
5.1.2.2	Relação entre a detecção do FeLV e o FIV	25
5.1.3	Ocorrência do <i>Toxoplasma gondii</i>	25
5.1.3.1	Relação entre a detecção do <i>Toxoplasma gondii</i> e o FIV	26
5.1.3.1	Relação entre a detecção do <i>Toxoplasma gondii</i> e o FeLV	27
5.1.4	Ocorrência do <i>Mycoplasma haemofelis</i>	27
5.1.4.1	Relação entre a detecção do <i>M. haemofelis</i> e a presença de ectoparasitas	28
5.1.4.2	Relação entre a detecção do <i>M. haemofelis</i> e o FeLV- sinais clínicos e hematológicos	28
5.2	Padronização da técnica de RIFI e IPMC para o FIV.....	28
5.2.1	Obtenção da CrFK persistentemente infectada	28
5.2.2	Tempos de fixação	28
5.2.3	Métodos de bloqueio	28
5.2.4	Reações específicas da RIFI e IPMC	28
5.2.5	Reações inespecíficas na RIFI e IPMC.....	29
5.3	Comparação entre as técnicas da RIFI, IPMC e <i>nested</i> PCR para o FIV	30
6.	CONCLUSÃO	32
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	32
ANEXO	Modelo da ficha clínica e de identificação dos felinos avaliados	38

LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS	síndrome da imunodeficiência adquirida
BIV	vírus da imunodeficiência bovina
CAEV	vírus da artrite-encefalite caprina
CDNA	DNA complementar
ConA	concanavalina A
Cm	centímetros
DNA	ácido deoxorribonucléico
ECP	efeito citopático
EIAV	vírus da anemia infecciosa eqüina
EUA	Estados Unidos da América
EDTA	etilenodiaminatetracetato de sódio
ELISA	ensaio imunoenzimático em fase sólida
FeLV	vírus da leucemia felina
FIPV	vírus da peritonite infecciosa felina
FIV	vírus da imunodeficiência felina
FTLV	vírus felino T-linfotrópico
FZB-BH	Fundação Zoobotânica de Belo Horizonte
G	força centrífuga
HIV	vírus da imunodeficiência humana
IPMA	immunoperoxidase in cell monolayer assay
IPMC	immunoperoxidase em monocamada celular
ICTV	comitê internacional de taxonomia de vírus
KDa	quilo Dalton
LTR	região longa repetida terminal
M	molar
Ma	miliampere
Me	México
mg	miligrama
ml	mililitro
mM	milimolar
MVV	vírus maedi-visna
NaN ₃	azida sódica
Nm	nanômetro
Pb	pares de bases
PBS	solução salina fosfatada
PCR	reação em cadeia pela polimerase
RFLP	polimorfismo de comprimento de fragmentos obtidos por restrição
RIFD	reação de imunofluorescência direta
RIFI	reação de imunofluorescência indireta
RNA	ácido ribonucléico
SFB	soro fetal bovino
SIV	vírus da imunodeficiência símia
SIFA	síndrome da imunodeficiência felina adquirida
TBE	tris-borato-EDTA
U	unidades
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
V	volts
µg	micrograma
µl	microlitro

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Ocorrência de FIV, FeLV, <i>Mycoplasma haemofelis</i> e <i>Toxoplasma gondii</i> em gatos errantes do campus da UFMG e FZB-BH e felinos selvagens da FZB-BH.	22
Tabela 2	Titulação pela RIFI para <i>Toxoplasma gondii</i>	26
Tabela 3	Comparação entre o teste de RIFI com a IPMC e a PCR para o FIV.	30
Tabela 4	Comparação entre o teste de IPMC com a RIFI e a PCR para o FIV.	31

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Esquema da transmissão do <i>Toxoplasma gondii</i>	16
Figura 2	Identificação por tatuagem no pavilhão auditivo dos gatos errantes.	18
Figura 3	Gel de agarose 1,5 % apresentando fragmento de 329 pb amplificado pela reação interna da PCR-FIV.	23
Figura 4	Gengivite e conjuntivite em um felino errante capturado no campus da UFMG e diagnosticado como positivo para o FIV na técnica da <i>nested</i> PCR.	24
Figura 5	Gel de agarose 1,5 % apresentando fragmento de 601 pb amplificado pela reação interna da PCR-FeLV.	24
Figura 6	Reação de imunofluorescência indireta. Taquizoítos evidenciando reação positiva. Taquizoítos evidenciando reação negativa apical devido ligação com conjugado.	25
Figura 7	Eritrócitos infectados pelo <i>Mycoplasma haemofelis</i>	27
Figura 8	Imunofluorescência indireta para o FIV. Reação positiva (A). Reação negativa (B).	29
Figura 9	Imunoperoxidase em monocamada celular para o FIV. Reação positiva (A). Reação negativa (B).	29
Figura 10	Reações inespecíficas presentes em 11 % dos soros testados.	30
Figura 11	Curva para o FIV de severidade de sinais clínicos X viremia X detecção de anticorpos.	31

RESUMO

Foram examinadas 19 amostras de felinos selvagens mantidos em cativeiro e 45 amostras de duas colônias de gatos domésticos errantes habitantes do campus da Universidade Federal de Minas Gerais e do Zoológico de Belo Horizonte para determinar a ocorrência do FIV, FeLV, *Toxoplasma gondii* e *Mycoplasma haemofelis*, estabelecendo correlações entre a ocorrência das enfermidades. Para o diagnóstico do FIV foi realizada a padronização das técnicas de imunofluorescência indireta (RIFI), e da reação de imunoperoxidase em monocamada celular (IPMC), e a aplicação dessas técnicas comparada com a reação em cadeia pela polimerase (PCR).

Palavras-Chave: Vírus da Imunodeficiência Felina (FIV), Vírus da Leucemia Felina (FeLV), PCR, RIFI e IPMC, *Toxoplasma gondii*, *Mycoplasma haemofelis*.

ABSTRACT

A total of 19 samples from wild feline kept in captivity and 45 samples of two colonies from domestic stray cats (*Felis catus*) living in the campus of the Federal University of Minas Gerais and Belo Horizonte Zoo botanical garden were tested to establish the occurrence of the FIV, FeLV, *Toxoplasma gondii* and *Mycoplasma haemofelis*, and correlations between the occurrence of the diseases. The standardization of indirect immunofluorescence a (FAT), and immunoperoxidase on cellular monolayer (IPMA), was established and the application of these was carried through techniques compared with the polymerase chain reactions (PCR) for diagnostic the FIV.

Keywords: Feline immunodeficiency virus (FIV), Feline Leukemia virus (FeLV), PCR, FAT, IPMA, *Toxoplasma gondii*, *Mycoplasma haemofelis*.

1. INTRODUÇÃO

Gatos domésticos (*Felis catus*) freqüentemente abandonados por seus proprietários, tornam-se adaptados e capazes de sobreviver em condições adversas organizando-se em estruturas sociais formando verdadeiras colônias (Centonze e Levy, 2002). Alguns desses animais aceitam o contato humano, enquanto alguns dos seus descendentes que originalmente nasceram livres, a partir da oitava semana de idade evitam o contato e provavelmente não permitem mais a aproximação humana. (MacDonald, *et al.* 2000). Esses grupos de gatos, designados de gatos domésticos errantes ou ferais são comumente encontrados em parques, praças, zoológicos e outras áreas urbanas convivendo em contato direto ou indireto com as pessoas e outros animais.

O campus da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), tornou-se um local oportuno para o desenvolvimento de colônias de gatos errantes. A disponibilidade de restos de alimentos e mesmo alimentos fornecidos por professores, funcionários, alunos e freqüentadores do campus da UFMG, assim como, as estruturas físicas das unidades, que facilitam o abrigo desses animais, propiciam a manutenção dessas colônias de gatos errantes. A estreita relação pela proximidade, mesmo que ocasional, ou indireta através de excreções e secreções, pode ser um risco na transmissão de zoonoses, como a toxoplasmose, para as pessoas que freqüentam esses locais.

O desenvolvimento e a manutenção de colônias de gatos errantes podem também ser um risco em potencial para a disseminação de doenças para outras espécies de animais. Em áreas pertencentes a zoológicos é comum a presença desses gatos errantes transitando livremente e estabelecendo contatos diretos e indiretos com felinos selvagens mantidos em cativeiro (Filoni e Catão-Dias, 2005). A possibilidade de relação entre esses animais, pode acontecer por exemplo, através do contato desses gatos errantes com alimentos fornecidos aos felinos

selvagens em cativeiro. Alimentos contaminados por secreções e excreções como saliva, urina e fezes, podem propiciar em algum momento, o contágio de algumas enfermidades como a toxoplasmose ou as retrovíroses felinas: vírus da imunodeficiência felina (FIV) e vírus da leucemia felina (FeLV). Esses gatos errantes são também propagadores de ectoparasitas, como as pulgas (*Ctenocephalides felis*), que são vetores para a micoplasmose causada pelo *Mycoplasma haemofelis*.

A interação entre determinadas infecções pode facilitar ou potencializar as manifestações de uma determinada enfermidade. O FIV e o FeLV são agentes imunossupressores que podem tornar os felinos acometidos mais susceptíveis a outras infecções como a micoplasmose e a toxoplasmose. Em infecções simultâneas em populações de felinos com o FIV e com *Toxoplasma gondii* essa interação pode resultar na reativação da toxoplasmose (Foster *et al.* 1998).

Por isso torna-se indispensável, o estabelecimento de técnicas de diagnóstico e o levantamento acerca das principais enfermidades que acometem esses gatos errantes para determinar o risco potencial que esses animais representam para a população humana na transmissão de zoonoses como a toxoplasmose, e na disseminação de determinados agentes na população de felinos selvagens mantidos em cativeiro nos zoológicos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Vírus da Imunodeficiência Felina

Isolado pela primeira vez em 1986, em Petaluma na Califórnia - EUA, de um gato com sorologia negativa para FeLV e que apresentava sinais clínicos característicos de uma síndrome de desordem imunológica (Pedersen *et al.*, 1987), o FIV foi inicialmente designado lentivírus felino T-linfotrópico (FTLV), devido o seu tropismo pelos linfócitos.

A partícula viral apresenta-se com forma esférica a helicoidal com 100-125 nm, circundado por um envelope que possui projeções em sua superfície. O genoma diplóide é constituído de duas cópias de fitas positivas de RNA, com aproximadamente 9.200 bases (Tochikura *et al.*, 1990).

O FIV, assim como todos os retrovírus, possui três genes principais chamados de *gag*, *pol* e *env*. Além dos genes acessórios *vif* (fator de infectividade viral) e *rev* que contribuem para uma eficiente replicação e persistência O gene *env* é responsável pela codificação das glicoproteínas de superfície importantes na interação com receptores celulares. O *gag* codifica proteínas internas sendo o gene mais conservado, enquanto o *pol* é responsável pela produção da enzima transcriptase reversa (Tang *et al.*, 1999).

O FIV e o vírus da imunodeficiência humana (HIV) pertencem à família *Retroviridae* e ao mesmo gênero dos lentivírus possuindo similaridades nas suas características biológicas e nas desordens clínicas e imunológicas que promovem (Shelton *et al.*, 1991; Dua *et al.*, 1994). Devido a essas similaridades, o FIV é considerado o melhor modelo animal para elucidação da patogenicidade, desenvolvimento e aperfeiçoamento de terapias antivirais, além do desenvolvimento e teste de vacinas (Bendinelli *et al.*, 1995).

2.1.1 Subtipos virais

Estudos do gene *env* do FIV demonstraram que os vírus isolados de gatos domésticos podem ser classificados em cinco subtipos, designados A, B, C, D e E. Entre os subtipos virais isolados em todo o mundo, 80% são do grupo A e B. Evidências sugerem que o subtipo B é o mais antigo e adaptado ao hospedeiro entre os subtipos do FIV (Bachmann *et al.*, 1997). Estudo recente realizado através da técnica de RFLP indicou a presença do subtipo B em gatos do estado de Minas Gerais (Caxito e Resende *et al.*, 2005).

Quando indivíduos são duplamente infectados com amostras virais de diferentes subtipos pode ocorrer à formação de

quasiespecies por recombinação, substituição, inserções ou deleções de nucleotídeos (Sabino *et al.*, 1994; Zhu *et al.*, 1995). Sendo esse fenômeno bem documentado na infecção por HIV (Cichutek *et al.*, 1992; Pedroza *et al.*, 1992; Eingen *et al.*, 1993; Brown *et al.*, 1994).

2.1.2 Transmissão

O mais eficiente modo de transmissão do FIV, comprovado por dados epidemiológicos e experimentais, é através de ferimentos por mordeduras (Yamamoto *et al.*, 1989). O vírus é eliminado em altas concentrações na saliva dos gatos infectados, que contém DNA proviral e RNA viral, evidenciando que na saliva o vírus se encontra tanto em células infectadas como linfócitos e macrófagos ou em *debris* celulares, como na forma extracelular.

O contato direto pode ser considerado como meio de transmissão em raras ocasiões (Pedersen *et al.*, 1987). Pesquisas sorológicas em residências com muitos gatos e com pelo menos um gato positivo para FIV, sugerem que a transmissão através do contato direto é ineficaz sob condições naturais (Shelton *et al.*, 1989).

O desenvolvimento de infecção por FIV em gatas inseminadas artificialmente com ejaculados de gatos soropositivos confirma que é possível a transmissão venérea através do sêmen (Jordan *et al.*, 1998).

A transmissão placentária ou colostrária de FIV de uma gata para suas crias não é freqüente (Yamamoto *et al.*, 1988). Foram documentadas experimentalmente as transmissões *in utero* e pós-natal, mas apenas quando a exposição inicial da gata ao FIV havia ocorrido durante a gestação ou lactação (Wasmoe, 1992).

2.1.3 Epidemiologia

2.1.3.1 *Felis catus*

Estudos sorológicos e de isolamento viral demonstram que o FIV possui distribuição mundial. A sua prevalência, dependendo do

país, oscila entre 1 a 30% (Bandeccchi *et al.*, 1992).

No Brasil estudos recentes têm confirmado a ocorrência do FIV: inquéritos sorológicos realizados no estado do Rio de Janeiro detectaram 16,6% de gatos positivos em 126 animais (Souza *et al.*, 2002) e 21% em 47 animais (Almeida, *et al.*, 2004). No Rio Grande do Sul, estudos moleculares detectaram pela técnica da reação em cadeia pela polimerase (PCR), o provírus do FIV em 37,5% das 40 amostras de sangue e tecido de gatos com suspeita clínica de FIV (Caldas *et al.*, 2000) em São Paulo 13,4% entre 500 gatos examinados (Taniwaki *et al.*, 2002) e Minas Gerais 2,7% entre 450 gatos (Caxito e Resende, 2003).

2.1.3.2 Lentivírus nos felinos selvagens

A ocorrência natural de lentivírus relacionados ao FIV tem sido documentada em várias espécies de felídeos selvagens em todo o mundo. Esses lentivírus relacionados ao FIV já foram detectados em leões (*Panthera leo*), leopardos (*Panthera pardus*), tigres (*Panthera tigris*), pumas (*Puma concolor*), leopardos da neve (*Panthera uncia*), onças (*Panthera onca*), "pallas cat" (*Felis manul*), "flat-headed cats" (*Ictailurus planiceps*), gueopardos (*Acinonix jubatus*) e lincês (*Lynx rufus*). Até o momento, nenhuma alteração imunológica ou sinal clínico foi observado em felídeos selvagens. O aparente caráter não patogênico da infecção dos lentivírus relacionados ao FIV em felídeos selvagens é paralelo com a situação da infecção pelo vírus de imunodeficiência símia (SIV) em macacos verdes africanos, em que episódios seletivos históricos, podem ter conferido adaptações genômicas do vírus, bem como do hospedeiro, produzindo assim, uma moderna coexistência (Barr *et al.*, 1989; Courchamp e Pontier, 1994).

2.1.4 Diagnóstico

A soroconversão ocorre de 2 a 4 semanas após a exposição ao vírus. A presença de anticorpos anti-FIV correlaciona-se bem com a infecção persistente por FIV (Yamamoto *et al.*, 1989). Existem testes

comerciais de ensaio imunoenzimático de fase sólida (ELISA), para uso em laboratórios, clínicas e hospitais veterinários, além de testes de imunofluorescência indireta e *western blot*, sendo que este último é considerado o teste padrão para detecção de anticorpos contra proteínas específicas do FIV (p24), confirmando resultados positivos ou retestando resultados falso-positivos pelo ELISA (Courchamp e Pontier, 1994). A imunofluorescência indireta tem sido descrita para o diagnóstico de diversas doenças infecciosas, como na imunodeficiência humana causada pelo HIV, com uma sensibilidade parecida ou até mesmo similar aos resultados apresentados pelo *western blot* (Carlson *et al.*, 1987).

Filhotes devem ser testados apenas com idade superior a 8-12 semanas para que não ocorram falso-positivos devido à interferência com anticorpos maternos e para que aconteça a completa soroconversão em um filhote positivo para o FIV (Barr *et al.*, 1991).

O isolamento do vírus em culturas de linfócitos T de gato e a detecção do seu DNA proviral em linfócitos ou RNA no plasma, através da reação em cadeia pela polimerase (PCR) são muito úteis no diagnóstico da infecção pelo FIV e como testes confirmatórios em gatos com resultados negativos ou indeterminados em testes imunológicos. O isolamento viral e a PCR são procedimentos ainda não disponíveis comercialmente, mas que podem ser realizados em algumas instituições de pesquisa (Spanger, 1993).

2.2 Vírus da Leucemia Felina

O vírus da leucemia felina (FeLV) é um gammaretrovírus que foi isolado pela primeira vez em 1964 na Escócia, a partir de um grupo de gatos com linfossarcoma. O FeLV está associado a uma série de doenças proliferativas, tais como leucemias, mielodisplasias, linfossarcoma além do desenvolvimento de anemias, doenças neurológicas e imunodeficiências nos animais infectados persistentemente (Faix *et al.*, 2002; Abujamra *et al.*, 2003).

O FeLV apresenta sua partícula viral em formato esférico com cerca de 115 nm e um capsídeo protéico icosaédrico circundado por um envelope lipoprotéico (Greene, 1990). O genoma constitui de duas moléculas de RNA lineares de fita simples senso positivo (Abujamra *et al.*, 2003).

2.2.1 Subtipos virais

O FeLV é classificado em três subtipos designados A, B e C, sorologicamente distintos, de acordo com diferenças estruturais, responsáveis pela utilização de três diferentes receptores nas células hospedeiras (Nakata *et al.*, 2003). Acredita-se que a origem desses subtipos esteja relacionada a recombinações e mutações virais e provirais (Neil e Onions, 1999).

Seqüências endógenas incompletas relacionadas ao FeLV estão presentes no genoma de todo gato doméstico. Estes provírus endógenos não são capazes de se replicar, mas há evidências de que os subtipos B e C do FeLV sejam resultado de recombinação a partir de vírus endógenos presentes no hospedeiro e de provírus do FeLV-A, que é exógeno. O subtipo C pode se originar da mesma forma ou ser produto de mutações do FeLV-A. Isto concorda com o fato de os subtipos B e C sempre se manifestarem na presença do subtipo A (Neil e Onions, 1999).

O FeLV-A é responsável pelo desenvolvimento de linfosarcomas de linfócitos T e imunodeficiências (Tailor *et al.*, 1999). O FeLV-B geralmente está associado com linfosarcomas e outras doenças mieloproliferativas (Chang *et al.*, 2001). Estudos epidemiológicos demonstram que o FeLV-B é encontrado, geralmente em 30 a 60% dos gatos infectados, concomitante com o FeLV-A, sugerindo assim que é rara a ocorrência de infecção provocada somente pelas amostras virais do subtipo B (Phipps *et al.*, 2000). A infecção pelo FeLV-C está associada com uma aplasia eritrocitária fatal. Provavelmente a doença resulta da ligação do vírus ao seu receptor nos eritroblastos da medula óssea impedindo a diferenciação à célula progenitora dos eritrócitos (Tailor *et al.* 1999).

2.2.2 Transmissão

Os animais persistentemente infectados eliminam grande quantidade de vírus na saliva e em menor quantidade nas secreções respiratórias, lágrima, sêmen, urina, leite e fezes. Dessa forma, a principal via de transmissão é através da saliva. O FeLV é transmitido de um gato infectado para um susceptível durante o ato de lambar, morder ou pelo compartilhamento de recipientes contendo alimentos e/ou água (Arjona *et al.*, 2000). Devido à instabilidade no meio ambiente, acredita-se que o contato freqüente ou prolongado entre os animais é necessário para que ocorra uma transmissão eficiente (Harbour *et al.*, 2002).

A transmissão do FeLV de gatas infectadas para os seus fetos em episódios no quais a infecção viral ocorreu durante o desenvolvimento embrionário podem resultar em morte e reabsorção fetal e, em alguns casos em aborto. Entretanto, alguns embriões podem sobreviver durante a gestação e os filhotes que nascem infectados são geralmente sendo acometidos de doenças relacionadas ao FeLV (Onions, 1985).

2.2.3 Epidemiologia

2.2.3.1 *Felis catus*

A incidência da infecção pelo FeLV esta relacionada à densidade populacional: gatil e residências com muitos gatos. Nestes grupos 70 a 100% dos gatos apresentam evidência sorológica de infecção, mas ocorre a infecção persistente em cerca de 30% dos gatos (Hardy Jr., 1987 e August, 1989).

No Brasil, estudos sorológicos realizados em São Paulo e no Rio de Janeiro revelaram que em 401 gatos analisados pelo ELISA, 8% foram positivos para o FeLV (Reche Jr. *et al.*, 1997) e em 113 gatos, 28,35% (Souza *et al.*, 2002) respectivamente.

2.2.3.2 FeLV nos felinos selvagens

Em felinos selvagens em ambiente de cativeiro, a infecção por FeLV é menos comum do que em felinos domésticos e ausente nas populações de vida livre nas Américas e África (Biek, *et al.*, 2002; Munson, *et al.*, 2004), mas tem sido encontrado em populações de vida livre na Arábia Saudita (Ostrowski *et al.*, 2003) e na Europa com prevalências semelhantes ou até maiores do que as detectadas em felinos domésticos que habitam os mesmos locais (Fromont, *et al.*, 2000).

2.2.4 Diagnóstico

O diagnóstico da infecção pelo FeLV baseia-se na história clínica e na detecção dos antígenos virais nos leucócitos, plasma, soro ou saliva dos animais infectados (Hardy, 1991). Os métodos de diagnóstico mais utilizados são a reação de imunofluorescência direta (RIFD) e o ensaio imunoenzimático (ELISA) (Miyazama, 2002).

O RIFD é capaz de detectar as proteínas virais p55 e p27 presentes no citoplasma dos leucócitos infectados (Herring *et al.*, 2001). O ELISA é capaz de detectar baixas concentrações da p27 no plasma, soro e saliva (August, 1991). Para a identificação de gatos persistentemente virêmicos, um teste ELISA positivo deve ser confirmado por teste de RIFD positivo (Hardy Jr. e Zuckerman, 1991).

A técnica de PCR tem sido utilizada atualmente com grande eficácia para a detecção do FeLV. Um teste de RT-PCR que detecta o RNA viral indica a viremia nos gatos infectados, enquanto a PCR para detecção do DNA proviral não necessariamente detecta um gato

persistentemente virêmico (Herring *et al.*, 2001).

2.3 *Toxoplasma gondii*

A toxoplasmose é causada pelo *Toxoplasma gondii*, um protozoário intracelular obrigatório. Considerada uma coccidiose dos felídeos, a toxoplasmose é uma das mais comuns protozoonoses disseminadas em todo o mundo (Hill e Dubey, 2002).

2.3.1 Transmissão

O gato doméstico e outros felídeos são os hospedeiros definitivos e muitas espécies de vertebrados, dentre anfíbios, peixes répteis e praticamente todos os animais de sangue quente, inclusive o homem, podem servir como hospedeiro intermediário.

Os felídeos são fundamentais na transmissão da toxoplasmose, sendo os únicos hospedeiros da forma sexuada e definitiva do parasita. Por eliminarem oocistos nas fezes os felinos são a única fonte de infecção dos animais herbívoros. Nestes animais, como os suínos, caprinos, ovinos e roedores, entre outros, ocorre apenas o ciclo extra-intestinal, com proliferação de taquizoítos nos órgãos e com a resposta imune, desenvolvem-se os cistos teciduais que contém centenas de bradizoítos. Os cistos teciduais permanecem viáveis e são infectantes para os gatos, bem como para outros hospedeiros intermediários, como o homem e cães (Figura 1). Nestes últimos a infecção geralmente pode acontecer pela ingestão de oocistos, presentes no solo ou alimentos de origem vegetal, ou através de carnes com cistos tissulares (Sparkes, 1998).

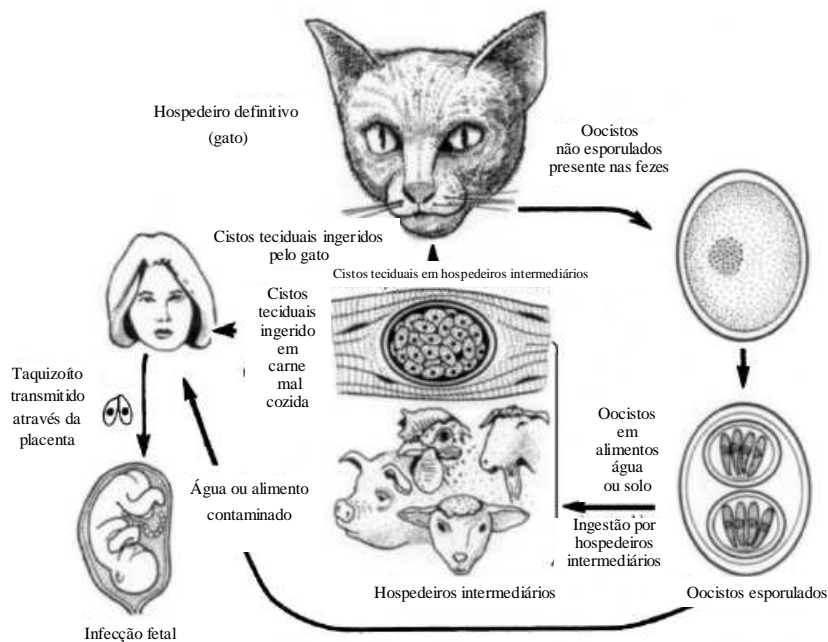


Figura 1- Esquema da transmissão do *Toxoplasma gondii*. In: Fenner *et al.* (1993).

Os humanos podem ser infectados através da ingestão de carne mal cozida (principalmente de suínos e ovinos) contendo cistos ou através da ingestão de oocistos na água, alimentos e contato direto com fezes de gatos infectados.

A transmissão congênita do *T. gondii* no ser humano pode ocorrer quando a infecção aguda coincide com a prenhez. O *T. gondii* multiplica-se na placenta, difundindo-se para os tecidos fetais, com conseqüências mais graves aos fetos no primeiro terço ou metade da gestação (Montoya e Liesenfeld, 2004).

2.3.2 Epidemiologia

A freqüência de anticorpos anti-toxoplasma na população de gatos varia de 0 a 90 % de animais sororeagentes. Esta variação pode estar relacionada ao tipo de população, sabe-se que resultados superiores são encontrados em populações de gatos de rua (Langoni *et al.*, 2001).

A variação da prevalência sorológica na população humana está correlacionada principalmente com o hábito alimentar e

higiênico (Desmonts *et al.*, 1965; Remington, *et al.*, 2001).

2.3.3 Diagnóstico

Os sinais clínicos resultantes da infecção pelo *T. gondii* não são específicos, sendo necessário o uso de técnicas indiretas como a RIFI, ELISA e o método de aglutinação direta ou diretamente por PCR, hibridização, isolamento e histologia (Hill e Dubey, 2002).

2.4 *Mycoplasma haemofelis*

Anteriormente descrito como uma rickettsia, a *Hemobartonella felis* é classificada atualmente no gênero *Mycoplasma* e atualmente é designada *Mycoplasma haemofelis* (Neimark *et al.*, 2001). Essa reclassificação se deve a estudos genéticos de análise seqüencial que evidenciaram uma maior semelhança com o gênero *Mycoplasma* (Rikihisa *et al.*, 1997) e foram confirmados por estudos de microscopia eletrônica, que demonstraram a ausência de parede celular (Birkeneuer *et al.*, 2002).

Esta bactéria extracelular infecta a superfície dos eritrócitos felinos (Flint e Moss, 1953; Jain e Keeton, 1973),

causando anemia hemolítica por destruição extravascular pelo sistema fagocitário mononuclear e lise intravascular por destruição direta da membrana celular ou aumento da fragilidade osmótica (Harvey e Gaskin, 1977). Depois da recuperação de uma infecção muitos felinos se tornam hospedeiros desenvolvendo um estado crônico da infecção (Splitter *et al.*, 1956).

2.4.1 Transmissão

Acredita-se que a transmissão do *M. haemofelis* ocorra principalmente por artrópodes hematófagos e possivelmente por feridas causadas por mordeduras de gatos (Greene, 1990). Woods *et al.*, 2005 através de infecção experimental e detecção por PCR confirmaram como vetor a pulga *Ctenocephalides felis* através da detecção do *M. haemofelis* nas fezes, forma adulta, larvas e ovos.

A transmissão vertical é possível, entretanto é considerada com menor importância. Carney e England, 1993 observaram a presença do *M. haemofelis* em filhotes com três horas de nascidos, filhos de mães portadoras.

A transmissão iatrogênica pode ocorrer através da transfusão sanguínea (Small e Ristic, 1987).

2.4.2 Diagnóstico

A infecção pelo *M. haemofelis* é comumente diagnosticada através da detecção do parasita na superfície dos eritrócitos em esfregaços sanguíneos periféricos corados por diversas técnicas de coloração tipo Romanowsky: Giemsa, May-Grunwald-Giemsa, Wright e Wright-Giemsa. (Bobade e Nash, 1987; Bobade *et al.* 1988).

Falsos positivos podem acontecer quando ocorre precipitação de estruturas devido à secagem e fixação incorreta dos esfregaços sanguíneos, assim como a presença de resquícios nucleares dos eritrócitos conhecidos como corpúsculos de Howell-Jolly, que devem ser diferenciados do *M. haemofelis* no teste por visualização direta.

Métodos sorológicos como *western blot* (Alleman *et al.*, 1999) e a RIFI também são utilizados para o diagnóstico, entretanto algumas variações antigênicas entre tipos de *M. haemofelis* podem não possuir reações cruzadas gerando falsos negativos (Foley *et al.*, 1998).

A infecção experimental para comparação entre o teste de visualização direta e a técnica da PCR mostrou uma sensibilidade superior para o PCR, demonstrando ser uma eficiente técnica de diagnóstico para o *M. haemofelis* (Westfall *et al.*, 2001).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

Estudo do FIV e sua relação com determinadas enfermidades infecciosas presentes em duas populações de gatos errantes e em felinos selvagens.

3.2 Objetivos específicos

Estabelecer a ocorrência do FIV, FeLV, *M. haemofelis* e *T. gondii* em duas populações de gatos errantes presentes no campus da UFMG e na Fundação Zoo-botânica de Belo Horizonte (FZB-BH) e em felinos selvagens da FZB-BH.

Estabelecer correlações entre a ocorrência de FIV, FeLV, *M. haemofelis* e *T. gondii*.

Padronizar e aplicar as técnicas de RIFI e IPMC para o diagnóstico do FIV.

Comparar as técnicas de RIFI, IPMC e *nested* PCR para o diagnóstico do FIV.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais avaliados

Um total de 64 felinos foram estudados durante o período de janeiro a novembro de 2005. Foram capturados e avaliados 45 gatos errantes (*Felis catus*), sendo 20 no campus da UFMG e 25 na FZB-BH. Dos felinos selvagens foram avaliados 19 animais, sendo 1 *Herpailurus yagouaroundi* (jaguarundi), 3 *Panthera leo* (leão); 3

Panthera onca (onça pintada); 2 *Panthera tigris* (tigre), 5 *Puma concolor* (onça parda ou suçuarana) e 5 *Leopardus pardalis* (jaguaririca).

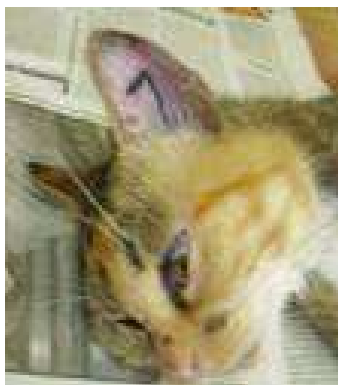
4.2. Captura e contenção dos felinos

Na captura e contenção dos gatos errantes foram utilizadas gaiolas-armadilhas distribuídas pelo campus da UFMG e na FZB-BH. Após a captura foi feita a contenção através de sedação, que também foi utilizada para a contenção dos felinos selvagens. A sedação foi realizada com a combinação de ketamina (Dopalen® – Laboratório Calier SA) na dose de 11 mg/Kg e xilasina (Dopaser® – Laboratório Calier SA) na dose de 2 mg/Kg por via intramuscular (Neilsen, 1999; Viana, 2003) inoculado por dardos anestésicos lançados por zarabatana, como descrito por Rossi Jr. e Moura, 2000.

4.3. Avaliação clínica dos felinos

Após a captura e a contenção, todos os felinos foram avaliados quanto à presença de ectoparasitas e submetidos a exame clínico. De acordo com a idade os gatos errantes foram classificados como: jovens (< de 6 meses) e adultos (> de 6 meses), baseada na análise da dentição de cada animal (Dyce *et al.*, 1990). As informações clínicas e de identificação foram transcritas para uma ficha individual (Anexo I).

4.4. Identificação dos felinos



Os gatos errantes foram identificados com numeração crescente, por ordem de captura, através de tatuagem na face interna do pavilhão auditivo esquerdo (Figura 2). Os gatos errantes capturados na UFMG receberam a letra “F” e os capturados na FZB-BH recebiam a letra “G” antes da numeração

Os felinos selvagens mantidos em cativeiro foram identificados através da leitura do *microchip* (Friendchip® AVID) implantado por via subcutânea de acordo com a identificação já utilizada na FZB-BH.

4.5. Coleta das amostras clínicas

As amostras de sangue foram coletadas por meio de punção da veia jugular com agulha hipodérmica (25x07) e seringas plásticas descartáveis de cinco mililitros (BD® Becton, Dickinson and Company). Sendo dois mililitros acondicionados em tubos siliconizados com etilenodiaminatetracetato de sódio (EDTA) a 10% como anticoagulante, para a realização da *nested* PCR para FIV e FeLV e hemograma completo; dois mililitros acondicionados em tubo sem anticoagulante para a realização dos exames sorológicos da RIFI para *T. gondii* e da RIFI e IPMC para o FIV. Foram preparadas duas lâminas de esfregaço sanguíneo para cada felino, oriundo da primeira gota de sangue capilar de extremidade de orelha para pesquisa de *Mycoplasma haemofelis*.



Figura 2- Identificação por tatuagem no pavilhão auditivo dos gatos errantes.

4.6. Diagnóstico para o FIV

Para o diagnóstico da infecção pelo FIV os animais foram testados por métodos sorológicos indiretos, através da RIFI e IPMC e por método direto, pela *nested* PCR.

4.6.1 Métodos sorológicos indiretos

4.6.1.1 Produção de células persistentemente infectadas

A produção de uma monocamada celular infectada persistentemente pelo FIV foi realizada com o objetivo de desenvolver os testes de RIFI e IPMC para o diagnóstico do FIV.

4.6.1.2 Células

Cultivo de CrFK - Crandell feline kidney (ATCC nº CCL 94) foi realizado em garrafas A25 (Greiner bio-one; cellstar) em capela de fluxo laminar, semeando-se 30.000 células/cm² em Meio Essencial Mínimo (MEM) com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) e antimicrobianos (2U/ml de penicilina, 2µg/ml de estreptomicina, 10µg/ml de fungizona).

4.6.1.3 Inoculação do vírus de referência (FIV-Petaluma) no cultivo de CrFK

Após 24 horas em estufa de CO₂ a 37°C, a partir de uma confluência de 80-90% da monocamada celular, foi realizada a inoculação viral do FIV-Petaluma (ATCC nº VR 1312). Para isto, o meio de crescimento foi retirado e, então lavado com PBS por três vezes. Inoculou-se 1 ml do vírus diluído 1:10 em MEM sem SFB. A adsorção viral ocorreu por 1 h a 37°C em estufa de CO₂ e após esse período foram adicionados 5 ml de MEM com 2% de SFB. O cultivo inoculado foi levado novamente à estufa de CO₂ a 37°C.

O sobrenadante da monocamada celular inoculada foi coletado com 7 dias pós-inoculação e novamente inoculado em uma nova monocamada de CrFK. Este procedimento foi repetido por duas vezes, quando a monocamada celular foi

tripsinizada e transferida para uma placa de 24 pocinhos (Greiner bio-one; cellstar) contendo lamínulas de vidro no fundo para a verificação da presença do vírus.

4.6.1.4 Fixação da monocamada infectada de CrFK

As lamínulas foram fixadas com 1, 3, 5 e 7 dias, para escolha do melhor tempo da infecção viral. Foi retirado o meio descartando-o em solução de hipoclorito a 3% em capela de fluxo laminar. O cultivo foi lavado três vezes com PBS. Após, foram adicionados acetona e álcool etílico a 1:2 (v/v) por 10 minutos à temperatura ambiente. A solução fixadora foi retirada e a placa mantida em estufa a 37°C até a evaporação total da solução. As placas foram embaladas em papel alumínio e mantidas a -20°C.

4.6.1.5 Métodos de bloqueio

Para o bloqueio de ligação inespecíficas foi testada albumina bovina diluída em PBS a 1, 2 e 5%, além de monocamadas infectadas e fixadas que não foram bloqueadas, servindo como controle. Foram utilizados 40 µl da solução bloqueadora por cada lamínula sobreposta em uma lâmina de vidro. O tempo de bloqueio foi de 30 minutos em estufa a 37°C. O procedimento de lavagem foi realizado três vezes com PBS e posteriormente a monocamada bloqueada foi deixada em temperatura ambiente para secar.

4.6.1.6 Obtenção de controles positivos e negativos para o FIV

4.6.1.6.1 Controle positivo

Um felino errante capturado no campus da UFMG sendo positivo para FIV e negativo para FeLV pela *nested* PCR foi utilizado como doador para a inoculação viral de dois mililitros de sangue, coletado em tubo siliconizado com heparina, em cada um dos dois felinos FIV negativos utilizados. O felino errante doador, positivo para o FIV, apresentava quadro clínico debilitante de caquexia, desidratação, linfadenomegalia,

alopecias, gengivite e periodontite no momento de sua captura.

A inoculação experimental para a produção de soro controle positivo foi realizada utilizando dois gatos (*Felis catus*, Linnaeus, 1758) com menos de 5-6 meses de idade, sendo um macho e uma fêmea, sem raça definida.

Os animais utilizados foram previamente testados pela *nested* PCR e confirmados como negativos para FIV e FeLV, (item 4.9 e 4.10.4).

4.6.1.6.2 Controle negativo

Monocamadas de CrFK não infectadas e soros negativos oriundos de animais negativos pela *nested* PCR foram utilizados como controle negativo para padronização da RIFI para o FIV.

4.6.1.7 Produção de conjugados anti-IgG felino

A imunoglobulina anti-IgG felino foi produzida através da imunização de coelhos inoculados com IgG purificada de felino, segundo Delves, 1995 e conjugada com isotiocianato de fluoresceína e peroxidase (SIGMA; St. Louis, EUA).

4.6.1.7.1 Conjugado anti-IgG felino / isotiocianato de fluoresceína

As frações obtidas do conjugado após separação por cromatografia em coluna com tamanho de 30 cm de Sephadex G-50, previamente equilibrada e diluída com PBS pH 7,2 para a separação das frações não conjugadas foram diluídas com glicerol na proporção de 1:2 e mantidos a -20°C até seu uso (Voss Jr., 1984).

Para a titulação do conjugado, diluições duplas de 1:40 a 1:1280 em solução a 2 % de Tween 80 e 0,02% de azul de Evans em PBS pH 7,2 foram incubadas durante 30 minutos em câmara úmida a 37°C. Após, realização de três lavagens com PBS, deixou-se à lâmina secar em temperatura ambiente. A maior diluição do conjugado que produziu fluorescência dos

microrganismos com a mínima coloração inespecífica foi selecionada.

4.6.1.7.2 Conjugado anti-IgG felino / peroxidase

A peroxidase tipo VI (SIGMA; St. Louis, EUA) foi oxidada com solução de m-periodato de sódio (SIGMA; St. Louis, EUA) 0,1 M em água destilada e alcalinizada com tampão carbonato-bicarbonato 0,5 M pH= 9,5. Após a oxidação e alcalinização da peroxidase realizou-se diálise com a imunoglobulina anti-IgG felino purificada, para que ocorresse a conjugação. (Lane, 1999).

Para a titulação do conjugado, diluições duplas de 1:40 a 1:1280 em PBS pH 7,2 foram incubadas durante 45 minutos em câmara úmida a 37°C. Após, foram realizadas três lavagens com PBS e posteriormente deixou-se à placa secar em temperatura ambiente. A maior diluição do conjugado que produziu melhores resultados de leitura e visualização das reações positivas e negativas com menor quantidade de reações inespecíficas, foi selecionada.

4.6.1.8 RIFI para o FIV

As monocamadas infectadas, fixadas e bloqueadas respectivamente, como descrito nos itens 4.6.1.3, 4.6.1.4 e 4.6.1.5 foram submetidas a 30 minutos de incubação em câmara úmida na estufa a 37°C com os soros testes em diluição dupla de 1:10 a 1:1280. Em seguida foram realizadas três lavagens com PBS, o conjugado com isotiocianato de fluoresceína produzido e titulado com descrito no item 4.6.1.7.1 foi incubado por 30 minutos em câmara úmida e após três lavagens com PBS a lâmina foi deixada secar a temperatura ambiente.

A lâmina contendo a monocamada foi montada em lâmina de vidro com 70 % de glicerol em PBS e a leitura realizada em microscópio óptico de luz invertida/fluorescência (Olympus BH2 – RFCA).

4.6.1.9 Imunoperoxidase em monocamada celular para o FIV

As monocamadas infectadas produzidas como descrito nos itens 4.6.1.3, 4.6.1.4 e 4.6.1.5 foram semeadas em placas de 96 pocinhos (Greiner bio-one; cellstar) e incubadas com os soros testes diluídos, como descrito no item 4.6.1.8. Em seguida foram realizadas três lavagens com PBS. O conjugado com peroxidase (item 4.6.1.7.2) foi incubado por 45 minutos em câmara úmida e após três lavagens com PBS a placa foi deixada secar a temperatura ambiente.

A reação foi revelada pela adição de 30 µl por pocinho do substrato 3-amino-9-etil-carbazol (AEC) por um período de 2 a 10 minutos, à temperatura ambiente. A reação de IPMC baseou-se em ensaios previamente descritos por Afshar *et al.*, 1991; Elahi *et al.*, 1997.

A leitura da reação de IPMC na placa de 96 pocinhos contendo a monocamada foi realizada em microscópio óptico de luz invertida (Leitz Diavert).

4.6.2 Nested PCR para o FIV

A *nested* PCR utilizada para a detecção do provírus para o FIV foi realizada como descrita por Hohdatsu, 1998 e modificada por Caxito e Resende, 2005.

4.7 Pesquisa direta para o *Mycoplasma haemofelis*

Os esfregaços sanguíneos foram corados pela técnica de Giemsa May Grunwald como descrito por Moura, 1994 e avaliados em microscópio óptico com objetiva de imersão 40X.

4.8 RIFI para *Toxoplasma gondii*

4.8.1 Preparação dos taquizoítos

As lâminas fixadas de taquizoítos foram produzidas pela inoculação de taquizoítos de alta virulência em camundongos (Sabin, 1941). (Gentilmente cedidas pelo Laboratório de Toxoplasmose - ICB)

4.8.2 Teste dos soros

Para a detecção de anticorpos anti-*T. gondii* foram realizadas diluições de 1:16, 1:64, 1:256, 1:1024 e 1:4096 dos soros em PBS pH 7,2 e incubados sobre as lâminas, durante 30 minutos em câmara úmida a 37°C. Em seguida foram realizadas três lavagens com PBS, o conjugado com isotiocianato de fluoresceína foi incubado por 30 minutos em câmara úmida e após foram realizadas três lavagens com PBS e, posteriormente deixou-se à lâmina secar em temperatura ambiente.

A lâmina foi montada com 70 % de glicerol em PBS sobreposta por uma lamínula de vidro e a leitura realizada em microscópio óptico de luz invertida/fluorescência (Olympus BH2 – RFCA).

4.9 Nested PCR para o FeLV

A *nested* PCR para a detecção do provírus para o FeLV foi realizada como descrita por Sheets *et al.*, 1993 e modificada por Coelho e Resende, 2003.

4.10 Hemogramas

O hemograma foi realizado utilizando o aparelho eletrônico de contagem de células (CELM – MOD.CC 510) e avaliados segundo, Jain, 1986 para o estudo e estabelecimento de relações entre as enfermidades avaliadas.

4.11 Análise estatística

A comparação entre as técnicas de PCR, RIFI e IPMC para o diagnóstico do FIV foi calculada avaliando-se o coeficiente Kappa de Cohen. Um valor de 1,0 indica o acordo perfeito entre os testes, valores entre 0,4 e 0,5 são considerados como uma equiparação moderada dos testes (Fleiss, 1981; Normando e Streiner, 1996). As análises estatísticas quando adequadas, foram realizadas pelo teste de Fisher (Sampaio, 2002).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Ocorrência do FIV, FeLV, *Mycoplasma haemofelis* e *Toxoplasma gondii*

A Tabela 1 mostra os resultados encontrados na detecção de FIV, FeLV, *M. haemofelis* e *T. gondii*.

Tabela 1- Ocorrência de FIV, FeLV, *Mycoplasma haemofelis* e *Toxoplasma gondii* em gatos errantes do campus da UFMG⁷ e FZB-BH⁸ e felinos selvagens da FZB-BH.

Felinos		N	Positivos PCR ¹		Positivos MIC. DIRETA	Positivos RIFI ⁵
			FIV ²	FeLV ³	<i>M. haemofelis</i> ⁴	<i>T. gondii</i> ⁶
		N	N (%)	n (%)	n (%)	n (%)
Errantes UFMG	♂	11	2 (18)	4 (36,4)	2 (18,2)	3 (27,3)
	♀	9	1 (11)	3 (33,3)	2 (22,2)	3 (33,3)
	Subtotal ♂♀	20	3 (15)	7 (35)	4 (20)	6 (30)
Errantes FZB-BH	♂	13	1 (7,7)	4 (30,8)	3 (23,1)	8 (61,5)
	♀	12	1 (8,3)	7 (58,3)	3 (25)	-
	Subtotal ♂♀	25	2 (8)	11 (44)	6 (24)	8 (32)
Selvagens	♂	14	1 (7,1)	3 (21,4)	5 (35,7)	14 (100)
	♀	5	-	2 (40)	1 (20)	4 (80)
	Subtotal ♂♀	19	1 (5,7)	5 (26,3)	6 (31,6)	18 (94,7)
<i>Puma concolor</i>	♂		-	+	-	+
	♂		-	-	-	+
	♂	5	-	-	+	+
	♂		-	-	-	+
	♀		-	-	-	+
<i>Panthera leo</i>	♂		-	-	+	+
	♂	3	-	+	-	+
	♂		-	-	-	+
<i>Panthera onca</i>	♂		-	+	+	+
	♂	3	-	-	+	+
	♂		-	-	-	+
<i>Leopardus pardalis</i>	♂		-	+	-	+
	♂		-	-	+	+
	♂	5	+	-	-	-
	♂		-	-	+	+
	♂		-	+	-	+
<i>H. yagouaroundi</i>	♂	1	-	-	-	+
<i>Panthera tigris</i>	♂	2	-	-	-	+
	♀		-	-	-	+
Total		64	6 (9,4)	23 (36)	16 (25)	32 (50)

¹ PCR= reação em cadeia pela polimerase; ² FIV= vírus da imunodeficiência felina; ³ FeLV= vírus da leucemia felina; *M. haemofelis*= ⁴ *Mycoplasma haemofelis*; ⁵ RIFI= reação de imunofluorescência indireta; ⁶ *T. gondii* = *Toxoplasma gondii*; ⁷ UFMG= Universidade Federal de Minas Gerais; ⁸ FZB-BH= Fundação Zôo-botânica de Belo Horizonte.

5.1.1 Ocorrência do FIV

Foram diagnosticados como positivas para o FIV cinco amostras de gatos errantes e uma amostra de felino selvagem (*Leopardus pardalis*, Tabela 1), através da *nested* PCR, observando-se a amplificação de um

segmento com 329 pares de base (pb) na segunda reação da PCR realizada a partir do segmento de 733 pb amplificado na primeira reação, sendo correspondente a uma seqüência do gene *gag* que foi visualizado no gel de agarose a 1,5 % (Figura 3).

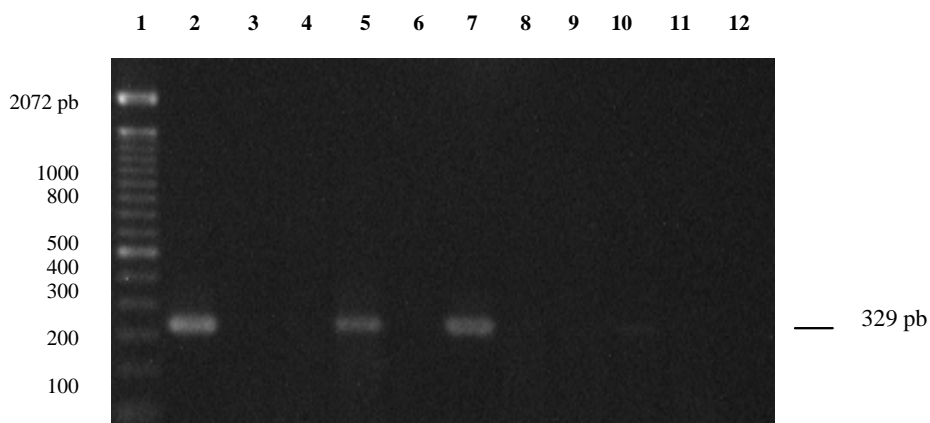


Figura 3- Gel de agarose 1,5 % apresentando fragmento de 329 pb amplificado pela reação interna da PCR-FIV. Canaleta 1- Padrão de peso molecular 100 bp. Canaleta 2- Controle positivo. Canaleta 3- Controle negativo. Canaletas 4,6,8,9,10,11,12- Amostras negativas. Canaletas 5 e 7- Amostras positivas

A detecção de quatro felinos machos (66%) e duas fêmeas (44%) dos seis felinos encontrados como positivo para FIV reporta a resultados consolidados na literatura como descrito por Pedersen *et al.*, 1989, que os gatos machos têm probabilidade três vezes maior do que as fêmeas de estarem infectados pelo FIV. Este fato é atribuído a maior probabilidade de agressão territorial, o que resulta em um número maior de ferimentos por mordedura nos gatos machos.

5.1.1.1 Relação entre a detecção do FIV - sinais clínicos e hematológicos

Em três gatos errantes e um felino selvagem positivo na técnica da *nested* PCR, nenhum sinal clínico foi observado. Este resultado sugere que estes animais possam estar na fase assintomática da infecção. Barlough, 1991 descreve que alterações clínicas, imunológicas e hematológicas não são

detectadas por períodos de 1,5 a 2 anos durante a fase assintomática (Barlough *et al.*, 1991).

Em um felino errante, macho e adulto capturado no campus da UFMG e positivo na *nested* PCR foi observado sinais clínicos de caquexia, alopecia na região da cabeça, conjuntivite, gengivite (Figura 4) e linfadenomegalia. O exame hematológico deste animal evidenciou anemia microcítica hipocrômica com leucograma demonstrando leucopenia com linfopenia e neutropenia. Esses sinais clínicos presentes em um felino em que o DNA proviral do FIV foi detectado, indica que os mesmos possam ser devido à síndrome da imunodeficiência felina. Sinais clínicos semelhantes foram descritos por Kohmoto *et al.*, 1998 em animais infectados experimentalmente e acompanhados durante oito anos. Esses sinais clínicos indicam que esse felino possa estar na fase final da síndrome. Durante essa fase a

viremia alcança índices elevados, sendo a eliminação viral principalmente através da saliva. Este fato, torna-se um considerável risco de transmissão, e conseqüente disseminação da infecção pelo FIV para outros animais em caso de mordeduras.

5.1.2 Ocorrência do FeLV

Foram diagnosticados como positivos para o FeLV, 7 (35%) e 11 (44%) amostras de gatos errantes da UFMG e da FZB-BH, respectivamente. Nos felinos selvagens da



Figura 4- Gingivite e conjuntivite em um felino errante capturado no campus da UFMG e diagnosticado como positivo na técnica da *nested* PCR.

Em outro felino errante, macho e adulto capturado no campus da UFMG e também positivo na técnica da *nested* PCR, foram observadas no membro posterior direito quatro lesões perfurativas em fase final de cicatrização, características de mordeduras, provavelmente devido a brigas com outros felinos. Esta observação está relacionada com dados consolidados na literatura comprovada por Tenório, et al. (1998), que descreveram a mordedura como sendo o meio de transmissão mais efetivo para a infecção pelo FIV

FZB-BH 5 (25,3%) também foram positivos, através da *nested* PCR, observando-se a amplificação de um segmento com 770 pares de bases (pb) na primeira reação e de um segmento de 601 pb pertencente ao segmento amplificado anteriormente, e correspondente a uma seqüência do gene *gag* que foi visualizado em gel de agarose 1,5% (Figura 5).

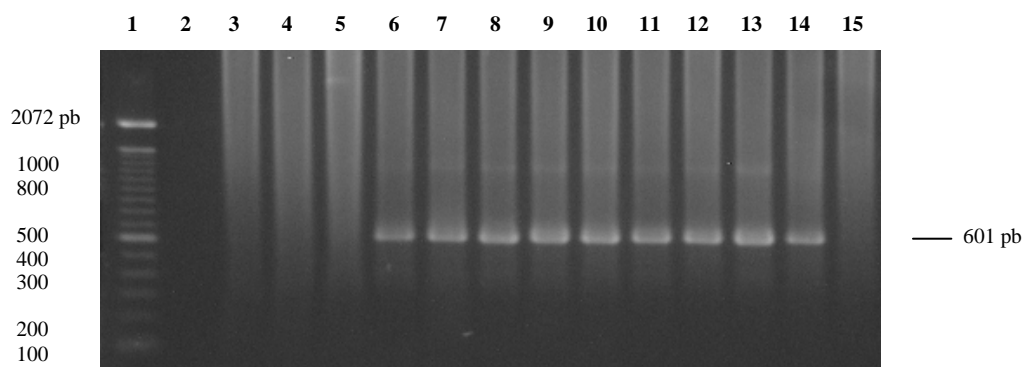


Figura 5- Gel de agarose 1,5 % apresentando fragmento de 601 pb amplificado pela reação interna da PCR-FeLV. Canaleta 1- Padrão de peso molecular 100 pb. Canaleta 2- Controle negativo. Canaletas 3-5 e 15 Amostras negativas. Canaletas 6-14 Amostras positivas.

Em populações de felinos em que o FeLV está presente, cerca de 65% dos animais infectados conseguem conter a replicação viral através de uma resposta imune adequada e a maior parte desenvolvem uma infecção autolimitante albergando o provírus latente apenas nas células da medula óssea. Dessa forma, em 35% dos gatos infectados há excreção e presença de vírus circulante ou na forma de provírus (Hoover *et al.*, 1991).

Dessa forma, os valores de ocorrência do FeLV encontrado nos gatos errantes da UFMG e nos felinos selvagens estão relacionados com a percentagem de felinos que após contato com o FeLV se tornam realmente infectados.

A ocorrência encontrada de 44% de gatos errantes da FZB-BH infectados pelo FeLV, pode ser devido a um número de felinos que obtiveram contato recente com o vírus e que poderão tornar futuramente a infecção autolimitante.

5.1.2.1 Relação entre a detecção do FeLV - sinais clínicos e hematológicos

Em quatro gatos errantes diagnosticados como positivos para o FeLV foram observados sinais clínicos de mucosa ocular moderadamente (dois) e discretamente pálida (dois). Em três desses animais foi constatado também emagrecimento

moderado, sendo que o exame hematológico evidenciou anemia arregenerativa. Enquanto que o outro animal apresentou anemia normocítica normocrômica.

Anemia arregenerativa é o achado hematológico mais comum em felinos infectados por FeLV, devido à multiplicação viral nas células primordiais eritrocitárias (Swango, 1997).

5.1.2.2 Relação entre a detecção do FeLV e o FIV

A observação que dos seis felinos diagnosticados positivos para FIV pela *nested* PCR, quatro (67,7%), também foram diagnosticados com positivos para FeLV, pode ser explicada pelo modo de transmissão comum às enfermidades. Yamamoto *et al.*, 1989 e Hoover e Mullis *et al.*, 1991, comprovaram a eficácia do modo de transmissão dessas enfermidades por mordeduras, respectivamente para FIV e FeLV.

5.1.3 Ocorrência do *Toxoplasma gondii*

A RIFI positiva foi evidenciada pela fluorescência de toda a superfície dos taquizoítos, enquanto a reação negativa apresentou fluorescência apical nos taquizoítos (Figura 6).

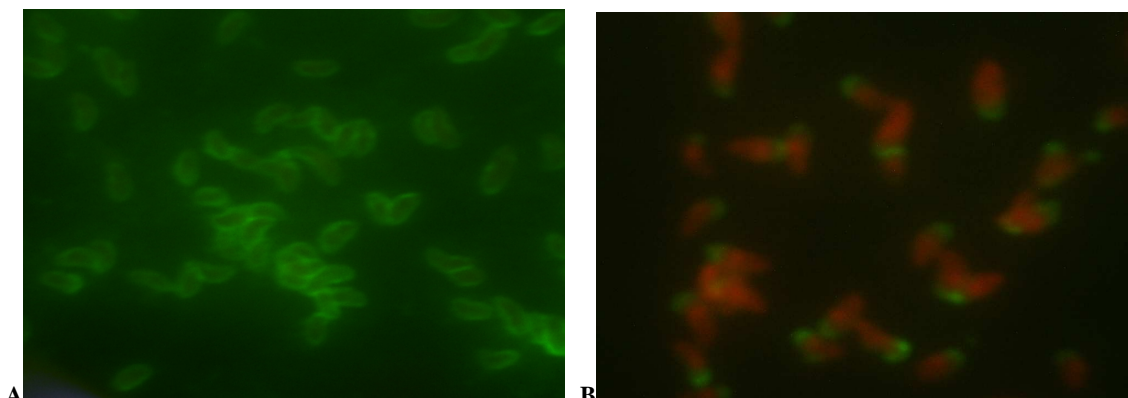


Figura 6- Reação de imunofluorescência indireta. Taquizoítos evidenciando reação positiva (A). Taquizoítos evidenciando reação negativa apical devido ligação com conjugado (B). 240X

A análise dos resultados da RIFI revelou nos gatos errantes do campus da UFMG e da FZB-BH uma ocorrência de 6 (30%) e 8 (32%), respectivamente. Nos felinos selvagens a ocorrência foi de 18 (94,7%) (Tabela 1).

A titulação do soro para a RIFI em que foi observada maior ocorrência nas três populações de felinos foi a com título de 1:256 (Tabela 2).

Tabela 2- Titulação pela RIFI para *Toxoplasma gondii*

População felinos	Titulação RIFI ¹ – <i>T. gondii</i>						Total
	1:16	1:164	1:256	1:512	1:1024	1:2048	
Errantes UFMG ²	2	1	3	-	-	-	6
Errantes FZB-BH ³	1	3	4	-	-	-	8
Selvagens	5	6	7	-	-	-	18
Total	8	10	14	0	0	0	32

¹ RIFI= reação de imunofluorescência indireta; ² UFMG= Universidade Federal de Minas Gerais; ³ FZB-BH= Fundação Zôo-botânica de Belo Horizonte

Os resultados demonstram a presença de infecção pelo *T. gondii* em gatos errantes, que podem ter oferecido, em algum momento, risco de infecção ao homem e a outros animais, pela eliminação de oocistos no ambiente. Por outro lado, adverte-se pela presença de grande número de animais susceptíveis, reforçando a necessidade de medidas profiláticas nestas populações, tais como a não alimentação com alimentos crus ou mal-cozidos, e o controle da natalidade dessas colônias de gatos errantes.

A frequência de anticorpos anti-*T. gondii* na população felina é variada, como demonstram autores como Salata *et al.*, 1985 e Rosa *et al.*, 1987 com variações de 0 a 90% de animais sororeagentes. A variação encontrada pode estar relacionada ao tipo de população estudada, uma vez que os animais avaliados não eram domiciliados. Sabe-se que prevalências superiores são encontrados em populações de gatos de rua, como mostram os trabalhos de Sogorb *et al.* 1972 e Camargo *et al.* 1998, que obtiveram reações em 50,9% e 37,7% dos soros felinos estudados, respectivamente. Miro *et al.*, 2004, em estudo sorológico na Espanha, comparando a prevalência entre felinos domiciliados e errantes encontrou 36,4% positivos em 365 gatos errantes e 25,5% em 220 felinos domiciliados.

Essa alta prevalência de 94,7 % de felinos selvagens da FZB-BH sororeagentes para

T. gondii pode ser explicada pela alimentação oferecida a esses animais como, por exemplo, a carne bovina crua. Nenhuma evidência clínica de toxoplasmose foi constatada nos felinos selvagens, entretanto é necessário determinar a fonte de infecção para esses animais. Silva *et al.*, 2001 encontrou sororeagentes com prevalência de 54,6% em 865 felinos selvagens de zoológicos de 20 estados brasileiros, que também foram alimentados com carne crua. A variação nestes resultados deve ser analisada considerando a origem da carne fornecida a esses animais o que pode explicar a alta prevalência encontrada. Dessa forma, a certificação das condições sanitárias desses alimentos, principalmente das carnes oferecidas a esses animais se mostra extremamente importante para evitar a disseminação da infecção pelo *T. gondii*.

5.1.3.1 Relação entre a detecção do *T. gondii* e o FIV

A toxoplasmose é descrita geralmente como um grave agente oportunista em felinos infectados por FIV. Nos gatos errantes dos cinco animais positivos para FIV, apenas um (20%) foi sororeagente para *T. Gondii*, apresentando-se positivo apenas no menor título pesquisado (1:16).

A observação da sorologia negativa para toxoplasmose apenas no único felino selvagem, positivo para FIV pela *nested*

PCR, pode refletir uma alteração na resposta imune causada pela infecção do FIV, impedindo a produção de anticorpos a nível detectável na RIFI.

Em infecções prolongadas pelo FIV (>25 meses), os gatos podem sofrer diminuição na capacidade da resposta aos antígenos dependentes de T, devido ao decréscimo dos linfócitos T CD4+; permanecendo apenas com as respostas imunológicas aos antígenos T independentes (Barlough *et al.*, 1991).

5.1.3.2 Relação entre a detecção do *T. gondii* e o FeLV

Em oito gatos errantes da FZB-BH sororeagentes para o *T. gondii* foram diagnosticados dois (25%) animais como positivo para o FeLV. Enquanto que, nos gatos errantes da UFMG dos seis gatos errantes sororeagentes para *T. gondii* apenas um (16,7%) foi positivo também para FeLV.

5.1.4 Ocorrência do *Mycoplasma haemofelis*

Na avaliação dos esfregaços sanguíneos, quatro (20%) dos gatos errantes da UFMG e quatro (16%) gatos errantes da FZB-BH e seis (24%) dos felinos selvagens apresentaram eritrócitos infectados pelo *M. haemofelis* (Figura 7).



Figura 7- Eritrócitos infectados pelo *Mycoplasma haemofelis* (seta). 240X.

5.1.4.1 Relação entre a detecção do *M. haemofelis* e a presença de ectoparasitas

A infestação por ectoparasitas (pulgas) foi observada em quatro (20%) dos gatos errantes capturados no campus da UFMG e 10 (40%) nos gatos errantes da FZB-BH, enquanto nos felinos selvagens a infestação foi observada em oito (42%) animais.

O confinamento em espaços menores que o ambiente natural dos felinos selvagens, promove uma densidade populacional extremamente elevada, o que proporciona condições para que estes felinos mantidos em cativeiro nos zoológicos sejam constantemente infestados por pulgas. A

constatação de que a população de felinos selvagens apresentava-se mais acometida por pulgas está relacionada com uma maior ocorrência do *M. haemofelis* observada nestes animais. Woods *et al.*, 2005 constatou o *Ctenocephalides felis* (pulga) como o vetor do *M. haemofelis*, através da presença de DNA em fezes, ovos e larvas de pulgas coletadas em gatos positivos.

Embora a presença do *M. haemofelis* parasitando os eritrócitos tenha sido encontrada em 38% dos felinos, apenas três animais apresentaram alguma alteração hematológica, além da variação normal dos parâmetros do hemograma. Este resultado confirma a existência de portadores assintomáticos em que a prevalência pode

aproximar a 30% em determinadas populações (Carney e England, 1993).

5.1.4.2 Relação entre a detecção do *M. haemofelis* e o FeLV – sinais clínicos e hematológicos

Foi constatada a presença de cinco gatos errantes da FZB-BH como positivos para *M. haemofelis*, sendo que esses felinos em que foram visualizados o *M. haemofelis* parasitando suas hemácias, foram também diagnosticados como positivos para FeLV pela *nested* PCR. Em três desses felinos foram observados sinais clínicos de mucosa ocular moderadamente pálida que a partir do exame hematológico evidenciou a presença de uma anemia normocrômica.

Este resultado pode ser atribuído à deficiência imunológica que a infecção pelo FeLV promove facilitando a infecção de agentes oportunistas como o *M. haemofelis*. Diversas infecções secundárias são esperadas quando existe a presença da infecção pelo FeLV, entre esses agentes secundários esta o *M. haemofelis* (Hopper *et al.*, 1994).

5.2 Padronização da técnica de RIFI e IPMC para o FIV

Para a realização dos testes sorológicos para o FIV uma monocamada persistentemente infectada com FIV Petaluma, assim com os tempos de fixação e métodos de bloqueio que propiciariam uma melhor observação das reações foram padronizados e estabelecidos.

5.2.1 Obtenção da CrFK persistentemente infectada

Após três passagens consecutivas utilizando como inóculo o sobrenadante do cultivo anterior inoculado com o vírus de

referência Petaluma, foi observado aparecimento de efeito citopático (ECP) apresentando 20 a 30% de acometimento da monocamada celular após 5-7 dias da inoculação.

O ECP observado foi caracterizado inicialmente com baloneamento e aglomeração celular com posterior descolamento e perda celular. Quando a monocamada era novamente propagada o efeito citopático era novamente observado entre 5 a 7 dias, indicativo de uma monocamada persistentemente infectada.

5.2.2 Tempos de fixação

O tempo de fixação com 24 horas da propagação da monocamada persistentemente infectada foi o que melhor evidenciou as reações positivas da RIFI, sendo que os outros tempos de fixação diminuíram a intensidade e a frequência das reações.

5.2.3 Métodos de bloqueio

A utilização de albumina na concentração de 1 e 4% em PBS para a técnica de RIFI e IPMC respectivamente, foram as melhores concentrações que permitiram a visualização da reação diminuindo a presença de reações inespecíficas.

A albumina a 4% em PBS para RIFI impediu a visualização das reações positivas e também a observação das reações inespecíficas.

5.2.4 Reações específicas da RIFI e na IPMC

As reações observadas na reação da RIFI se caracterizavam por fluorescência perinuclear, nuclear e citoplasmática. As regiões onde as reações se encontravam eram dispersas por toda a monocamada celular (Figura 8).

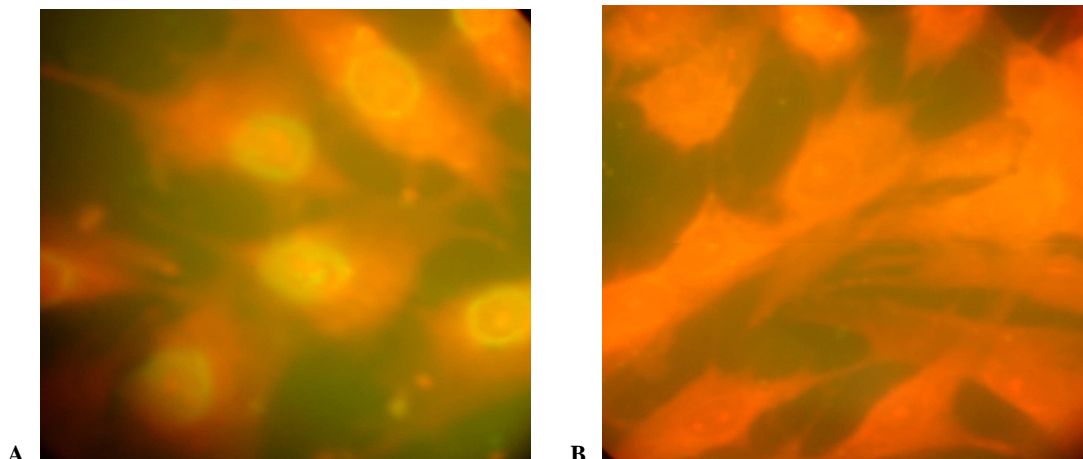


Figura 8- Imunofluorescência indireta para o FIV. Reação positiva (A). Reação negativa (B). 240X.

No IPMC as reações se caracterizavam por intensa coloração da membrana nuclear, assim como das outras estruturas celulares,

sendo que determinadas regiões circunferenciais apresentavam áreas com maior coloração (Figura 9).

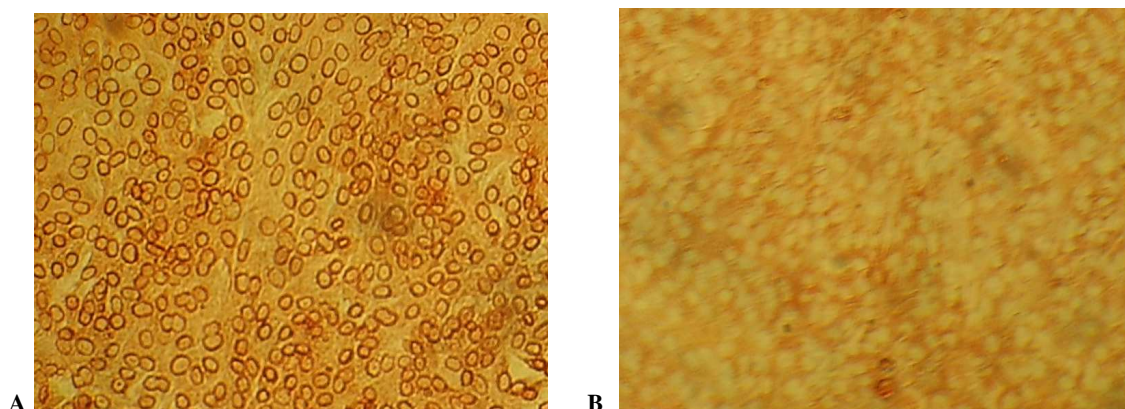


Figura 9- Imunoperoxidase em monocamada celular para o FIV. Reação positiva (A). Reação negativa (B).

5.2.5 Reações inespecíficas na RIFI e na IPMC

Reações inespecíficas foram observadas como fluorescência apenas na membrana nuclear (Figura 10), quando comparada com as reações positivas em que foram observadas fluorescências perinucleares, nucleares e citoplasmáticas. Neste trabalho, a presença de reações inespecíficas foi descrita em soros positivos e negativos em

7 amostras (11%), sendo necessária à comparação com o controle negativo de uma monocamada não infectada para a leitura do resultado.

Mortola *et al.*, 2004 relatou cerca de 6% de reações inespecíficas na técnica de RIFI para o FIV, enquanto que Barr *et al.*, 1991 e Reid *et al.*, 1992 descrevem essas reações em até 10% dos soros felinos podendo gerar falso-positivos.

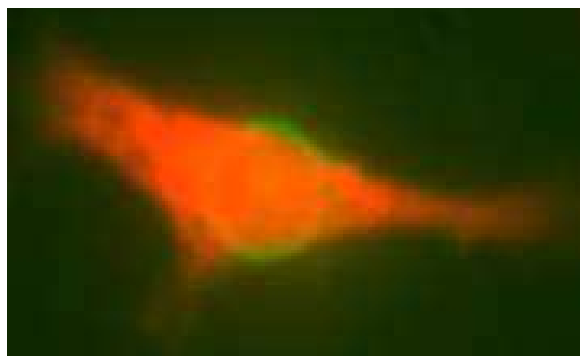


Figura 10- Reações inespecíficas presentes em 11 % dos soros testados. 270X.

As reações inespecíficas encontradas na IPMC foram caracterizadas como uma discreta coloração na monocamada celular em comparação com o controle negativo, mas que não evidenciava as colorações de estrutura celular observadas no controle positivo.

5.3 Comparação entre as técnicas da RIFI, IPMC e *nested* PCR para o FIV

Foram observadas quatro amostras (6,25 %) soropositivas nas técnicas de RIFI e IMPC, mas negativas na *nested* PCR

(Tabela 3 e 4). Falsos positivos são descritos em felinos jovens devido à transferência de anticorpos maternos via placenta ou colostro (Yamamoto *et al.*, 1989). Por este motivo, felinos jovens devem ser testados apenas com idade superior a 8-12 semanas para que não ocorram falso-positivos devido à interferência de anticorpos maternos. (Barr *et al.*, 1991). Essas amostras soropositivas e virus-negativas são referentes a animais que apresentaram dentição correspondente à idade inferior a seis meses, podendo indicar nestes casos uma persistência de anticorpos maternos.

Tabela 3- Comparação entre o teste de RIFI com a IPMC e a PCR para o FIV.

	PCR – FIV			Se¹ %	Es² %	C³ %	D⁴ %	Valor p⁵	K⁶
	Positivo	Negativo	Total						
RIFI - FIV									
Positivo	5	4	9	83,3	93,1	92,2	7,8	< 0,0001	0,624
Negativo	1	54	55						
Total	6	58	64						
IPMC – FIV									
	Positivo	Negativo	Total	Se %	Es %	C %	D %	Valor p	K
RIFI - FIV									
Positivo	8	1	9	100	98,2	98,4	1,6	< 0,0001	0,932
Negativo	-	55	55						
Total	8	56	64						

¹Se= Sensibilidade; ²Es= Especificidade; ³C= taxa de concordância; ⁴D= taxa de discrepância; ⁵Valor p= teste de Fisher (valor de significância P<0,05); ⁶K= coeficiente kappa; RIFI= reação de imunofluorescência indireta; IPMC= imunoperoxidase em monocamada celular; PCR= Reação em cadeia pela polimerase.

Na comparação entre as técnicas de RIFI e IPMC para o FIV foi observada uma amostra de felino selvagem positiva para a técnica de RIFI e negativa no IPMC (Tabela 4 e 5). Este resultado pode indicar diferença de sensibilidade relativa ao tipo de revelação

e/ou visualização dos métodos, uma vez que todas as outras variáveis dos testes foram semelhantes e pelo fato dessa amostra em questão ter sido positiva na técnica da PCR.

Tabela 4- Comparação entre o teste de IPMC com a RIFI e a PCR para o FIV.

		PCR – FIV			Se¹ %	Es² %	C³ %	D⁴ %	Valor p⁵	K⁶
		Positivo	Negativo	Total						
IPMC - FIV										
	Positivo	4	4	8	66,7					
	Negativo	2	54	56		93,1				
	Total	6	58	64			90,6	9,4	< 0,0001	0,520
		RIFI – FIV			Se %	Es %	C %	D %	Valor p	K
		Positivo	Negativo	Total						
IPMC - FIV										
	Positivo	8	-	8	88,9					
	Negativo	1	55	56		100				
	Total	9	55	64			98,4	1,6	< 0,0001	0,932

¹Se= Sensibilidade; ²Es= Especificidade; ³C= taxa de concordância; ⁴D= taxa de discrepância; ⁵Valor p= teste de Fisher (valor de significância P<0,05); ⁶K= coeficiente kappa; RIFI= reação de imunofluorescência indireta; IPMC= imunoperoxidase em monocamada celular; PCR= Reação em cadeia pela polimerase.

A detecção de um felino errante capturado no campus da UFMG, positivo para FIV pela técnica da *nested* PCR e sorologicamente negativo pela RIFI e IPMC, reporta a resultados similares encontrado por Dandekar, *et al.* 1992. A soroconversão acontece de 2 a 4 semanas após a exposição ao vírus, de acordo com Yamamoto *et al.*, 1988. Entretanto esse animal, como relatado no item 5.1.1.1,

apresentava sinais clínicos da fase final da SIFA não caracterizando assim, uma infecção recente. A presença de anticorpos anti-FIV correlaciona-se bem com a infecção persistente por FIV (Yamamoto *et al.*, 1989). Contudo, Hopper *et al.*, 1989 demonstrou que 15% dos felinos vírus positivos, geralmente com 3-4 anos pós-infecção para o FIV são sorologicamente negativos (Figura 11).

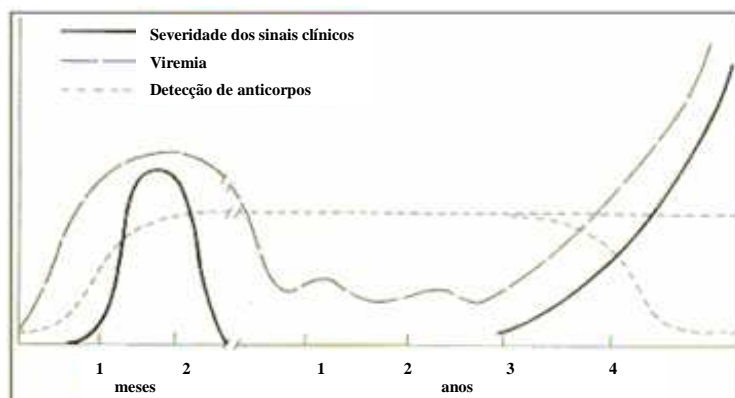


Figura 11- Curva para o FIV de severidade de sinais clínicos X viremia X detecção de anticorpos. In: <http://www.maas.med.cornell.edu>

6. CONCLUSÕES

Os resultados encontrados mostram uma ocorrência significativa das retrovirose felinas (FIV e FeLV) nas populações de gatos errantes da UFMG e da FZB-BH, havendo correlações com ocorrência de infecções oportunistas (*M. haemofelis*, *T. gondii*).

A existência de numerosas colônias de gatos errantes constitui um risco em potencial para a disseminação de enfermidades para as espécies em conservação de felinos selvagens mantidos em cativeiro, assim como para a própria população humana, no caso das zoonoses.

O diagnóstico molecular através da PCR mostrou-se mais eficiente no diagnóstico do FIV do que as técnicas sorológicas de RIFI e IPMA, uma vez que a infecção pelo FIV pode resultar em alterações imunológicas comprometendo a eficiência destes testes sorológicos e em situações em que a presença da imunidade passiva possa gerar falsos positivos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABUJAMRA, A.L.; FALLER, D.V.; GHOSH, S.K. Mutations that abrogate transactivation activity of the feline leukaemia virus long terminal repeat do not affect virus replication. **Virology**, v. 309, n. 1, p. 294-305, 2003.
- ALLEMAN, A.R.; PATE, M.G.; HARVEY, J.W. et al. Western immunoblot analysis of the antigens of *Haemobartonella felis* with sera from experimentally infected cats. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 1, p. 1474-1479, 1999.
- ALMEIDA, F.M.; FARIA, M.C.F.; BRANCO, A.S. et al. Sanitary conditions of a colony of urban feral urban cats (*Felis catus*, LINNAEUS, 1758) in a zoological garden of Rio de Janeiro, Brazil. **Revista Instituto Medicina Tropical de São Paulo**, v. 46, n. 5, p. 269-274, 2004.
- ARJONA, A.; ESCOLAR, E.; SOTO, I. et al. Seropidemiological survey of infection by leukemia virus and immunodeficiency virus in Madrid and correlation with some clinical aspects. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 1, p. 3448-3449, 2000.
- AUGUST, J.R. Feline viral disease. In: ETTINGER, S.J. (Ed): *Veterinary internal medicine*, 3. ed. Philadelphia, WB Saunders, 1989. p. 32-340.
- AUGUST, J.R. Husbandry practices for cats infected with feline leukemia virus or feline immunodeficiency virus. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 199, n. 1, p. 1475-1481, 1991.
- BACHMANN, M.H.; MATHIASON-DUBARD, C.; LEARN, G.H. et al. Genetic diversity of feline immunodeficiency virus: dual infection, recombination and distinct evolutionary rates. **Journal of Virology**, v. 71, n.1, p. 4241-4253, 1997.
- BANDECCHI, P.; MATTEUCHI, D.; BALDINOTTI, F. et al. Prevalence of feline immunodeficiency virus and other retroviral infections in sick cats in Italy. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 31, n. 1, p. 337-345, 1992.
- BARLOUGH, J.E.; ACKLEY, C.D.; GEORGE, J.W. et al. Acquired immune dysfunction in cats experimentally induced feline immunodeficiency virus infection: comparison of short-term and long-term infections. **Journal Acquired Immune deficiency Syndrome**, v. 4, n. 1, p. 219-227, 1991.
- BARR, M.C.; CALLE, P.P.; ROELKE, M.E. Feline immunodeficiency virus infections in nondomestic felids. **Journal Zoo Wildlife Medicine**, v. 20, n.1, p. 265-272, 1989.
- BARR, M.C.; POUGT, M.B.; JACOBSON, MS. Comparison and interpretation of diagnostic tests for feline immunodeficiency virus infection. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, v. 199, n. 1, p. 1377, 1991.
- BENDINELLI, M.; PISTELLO, M.; LOMBARDI, S. et al. Feline Immunodeficiency virus: an interesting model for AIDS studies and important cat

pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 8, n. 1, p. 87-112, 1995.

BIEK, R.; ZARNKE, R.L.; GILLIN, C. et al. Serologic survey for viral and bacterial infections in western populations of Canada Lynx (*Lynx canadensis*). **Journal of Wildlife Disease**, v. 38, n. 4, p. 840-845, 2002.

BIRKENHEUER, A.J.; BREITSCHWEDT, E.B.; ALLEMAN, A.R. Differentiation of *Haemobartonella canis* and *Mycoplasma haemofelis* on basis of comparative analysis of gene sequences. **American Journal of Veterinary Research**, v. 63, n. 10, p. 1385-1388, 2002.

BOBADE, P.A.; NASH, A.S. A comparative study of the efficiency of acridine orange and some Romanowsky staining procedures in the demonstration of *Haemobartonella felis* in feline blood. **Veterinary Parasitology**, v. 26, n. 1, p. 169-172, 1987.

BOBADE, P.A.; NASH, A.S.; ROGERSON, P. Feline haemobartonellosis: Clinical, haematological and pathological studies in natural infections and the relationship to infection with feline leukemia virus. **Veterinary Record**, v. 122, n. 2, p. 32-36, 1988.

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 pela polimerase. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 11, n. 1, p. 1395-1399, 2000.

CAMARGO, M. C. G. O.; MOURIZ, E. S. M.; D'AURIA, S. R. N. D.; FRAGA, G. M. D. Toxoplasmose em felinos do município de São Paulo – Brasil, 1993-1995. In: **Congresso Argentino de Zoonosis**, Buenos Aires. Anais... Buenos Aires: Asociación Argentina de Expertos en Zoonosis, 1998, p. 97.

CARLSON, J.R.; YEE, J.; HINRICHS, S.H. et al. Comparison of indirect immunofluorescence and Western blot for detection of anti-human immunodeficiency virus antibodies. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 25, n. 1, p. 494-497, 1987.

CARNEY, R.S.F.; ENGLAND, J.J. Feline haemobartonellosis. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 1, n. 23, p. 79-80, 1993.

CAXITO, F.A.; COELHO, F.M.; OLIVEIRA, M.E.; RESENDE, M. Feline Immunodeficiency virus subtype B in domestic cats in Minas Gerais, Brazil. **Veterinary Research Communications**, v. 29, n. 1, p. 1-4, 2005.

CAXITO, F.A.; RESENDE, M. **Detecção e subtipagem do vírus da imunodeficiência felina em Minas Gerais**. 2003. 90 f. Dissertação (Mestrado) - Escola de Veterinária. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte.

CENTONZE, L.A.; LEVY, J.K. Characteristics of free-roaming cats and their caretakers. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 220, n. 1, p. 1627-1633, 2002.

CHANG, Z.; PAN, J.; LOGG, C. et al. A replication competent feline leukemia virus, subgroup A (FeLV A), tagged with green fluorescent protein reporter exhibits in vitro biological properties similar to those of the parental FELV A. **Journal of Virology**, v. 75, n. 1, p. 8837-8841, 2001.

CICHUTEK, K.; MERGET, H., NORLEY, S. et al. Development of a quasispecies of human immunodeficiency virus type 1 *in vivo*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 1, p. 7365-7369, 1992.

COELHO, F.M.; RESENDE, M. **Ocorrência do DNA proviral do vírus da leucemia felina em *Felis catus* detectado por nested-PCR**. 2003. 99 f. Dissertação (Mestrado) - Escola de Veterinária. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte.

COURCHAMP, F.; PONTIER, P.: Feline immunodeficiency virus: an epidemiology review. **Comptes rendus de L'academie des Sciences Paris**, v. 317, n. 1, p. 1123-1134, 1994.

- DANDEKAR, S.; BEEBE, A.M.; BARLOUGH, J. et al. Detection of Feline Immunodeficiency Virus (FIV) Nucleic Acids in FIV-Seronegative Cats. **Journal of Virology**, v. 66, n. 1, p. 4040-4049, 1992.
- DELVES, D.J.: **Antibody Application's** – essencial techniques. Guildford: John Wiley & Sons, 1995.
- DESMONTS, G.; COUVREUR, J.; ALISON, F. et al. Etude epidemiologique sur la toxoplasmose: l'influence de la cuisson des viandes de boucherie sur la fréquence de l'infection humaine. **Revue Française d'études Cliniques et Biologiques**, v.10, n. 1, p. 952–58, 1965.
- DUA, N; REUBEL, G.; MOORE, P.F. An experimental study of primary feline immunodeficiency virus infection in cats and a historical comparison to acute simian and human immunodeficiency virus diseases. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 43, n. 1, p. 337-335, 1994.
- DYCE, K.M.; SACK, W.O.; WENSING, C.J.G. **Tratado de anatomia veterinária**. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1990. p. 567.
- FAIX, P.H.; FELDEMAN, S.A.; OVERBAUGH, J.; EIDEN, M.V. Host range and receptor binding properties of vectors bearing feline leukemia virus subgroup B envelopes can be modulated by envelope sequences outside of receptor binding domain. **Journal of Virology**, v. 74, n. 1, p. 2926-2929, 2000.
- FILONI, C.; CATÃO-DIAS, J.L. Infecções por retrovírus (FeLV e FIV) em felídeos selvagens – revisão – parte 1. **Clínica Veterinária**, v. 10, n. 54, p. 56-64, 2005.
- FLEISS, J.L. **Statistical methods for rates and proportions**. 2.ed. New York: Wiley & Sons, 1981.
- FLINT, J.C.; MOSS, L.C. Infectious anemia in cats. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 122, n. 1, p. 45-48, 1953.
- FOLEY, J.E.; HARRUS, S.; POLAND, A. et al. Molecular, clinical, and pathologic comparison of two distinct strains of *Haemobartonella felis* in domestic cats. **American Journal of Veterinary Research**, v. 59, n. 1, p. 1581–1588, 1998.
- FOSTER, S.F.; CHARLES, J. A.; CANFELD, P.J. Reactivated toxoplasmosis in a FIV – positive cat. **Australian Veterinary Practitioner**, v. 28, n. 4, p. 59-63, 1998.
- FROMONT, E.; SAGER, A.; LÉGER, F. et al. Prevalence and pathogenicity of retroviruses in wild cats in France. **Veterinary Record**, v. 146, n. 11, p. 317-319, 2000.
- GREENE, G.E. **Infections disease of the dog and cat**. 2. ed. Philadelphia, WB Saunders Company, 1990. p. 971.
- HARBOUR, D.A.; GUNN-MOORE, D.A.; GRUFFYDD-JONES, T.J. et al. Protection against oronasal challenge with virulent feline leukemia virus lasts for at least 12 months following a primary course of immunization with Leukocell™ 2 vaccine. **Vaccine**, v. 20, n. 1, p. 2866-2872, 2002.
- HARDY, W.D.: General principles of retrovirus immunodetection tests. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 199, n. 1, p. 1283-1287, 1991.
- HARDY JR., W.D. Oncogenic viruses of cats: The feline leukemia and sarcoma viruses. In: HOLZORTH, J. (Ed): **Disease of the cat: medicine and surgery**. Philadelphia, WB Saunders, 1987. p. 246-272.
- HARDY JR., W.D.; ZUCKERMAN, E.E. Ten-year study comparing enzyme-linked immunosorbent assay with the immunofluorescent antibody test for detection of feline leukemia virus infection in cats. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 199, n. 1, p. 1365-1373, 1991.
- HARVEY, J.W.; GASKIN, J.M. Experimental feline haemobartonellosis. **Journal American Animal Hospital Association**, v. 13, n. 1, p. 28-38, 1977.

- HERRING, I.P.; TROY, T.E.; CHAMPAGNE, E.S. et al. Feline leukemia virus detection in corneal tissues of cats by polymerase chain reaction and immunohistochemistry. **Veterinary Ophthalmology**, v. 4, n. 1, p. 119-126, 2001.
- HILL, D.; DUBEY, J.P. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. **Clinical Microbiology Infect**, v. 8, n. 1, p. 634-640, 2002.
- HOHDATSU, T.; MOTOKAWA, K.; USAMI, M. et al. Genetic subtyping and epidemiological study of feline immunodeficiency virus by nested polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of gag gene. **Journal of Virology Methods**, v. 70, n. 1, p. 107-111, 1998.
- HOOVER, E.A.; MULLINS, J.I. Feline leukemia virus infection and disease. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 199, n. 10, p.1287-1297, 1991.
- HOPPER, C.D.; SPARKES, A.H.; GRUFFYDD-JONES, T.J. et al. Clinical and laboratory findings in cats infected with feline immunodeficiency virus. **Veterinary Record**, v. 125, n. 13, p. 341-346, 1989.
- JORDAN, H.L.; HOWARD, J.G.; BUCCI, J.G. et al. Horizontal transmission of feline immunodeficiency virus with semen from seropositive cats. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 41, n. 1, p. 341-357, 1998.
- KOHMOTO, M.; UETSUKA, K.; IKEDA, Y. et al. Eight-year observation and comparative study of specific pathogen-free cats experimentally infected with feline immunodeficiency virus (FIV) subtypes A and B: Terminal acquired immunodeficiency syndrome in a cat infected with FIV Petaluma strain. **Journal Veterinary Medical Science**, v. 60, n. 3, p.315-321, 1998.
- LANE, D. **Using antibodies – a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1999.
- LANGONI, H.; SILVA, A. V.; CABRAL, K. G. et al. Prevalência de toxoplasmose em gatos dos Estados de São Paulo e Paraná. **Braz. Journal Veterinary Research Animal Science**, v. 38, n. 5, p. 243-244, 2001.
- MacDONALD, D.W.; YAMAGUSHI, N.; KERBY, G. Domestic cat: its sociobiology and epidemiology. In: TURNER, D.C.; BATESON, P. **The domestic cat: the biology of its behaviour**. 2. ed. London, Cambridge University Press, 2000. p. 96-115.
- MIYAZAWA, T. Infections of feline leukaemia virus and feline immunodeficiency virus. **Frontiers in Bioscience**, v. 7, n. 1, p. 504-518, 2002.
- MONTOYA, J.G.; LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. **The Lancet**, v. 363, n. 1, p.1965-1976, 2004.
- MORTOLA, E.; OLIVA, G.; RISSO, M. et al. Feline immunodeficiency virus infection: a comparative study of different diagnostic techniques. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária Zootecnia**, v. 56, n. 1, p.13-18, 2004.
- MUNSON, L.; MARKER, L.; DUBOVI, E. et al. Serosurvey of viral infections in free-ranging Namibian cheetahs (*Acinonyx jubatus*). **Journal of Wildlife Disease**, v. 40, n. 1, p.23-31, 2004.
- NAKATA, R.; MIYAZAWA, T.; SHIN, Y.S.; et al. Reevaluation of host ranges of feline leukemia virus subgroups. **Microbes and Infection**, v. 5, n. 1, p. 947-950, 2003.
- NIELSEN, L. **Chemical immobilization of wild and exotic animals**. Iowa: State University, 1999. p.31-82.
- NEIMARK, H.; JOHANSSON, K.E.; RIKIHISA, Y.; TULLY, J.G. Proposal to transfer some members of the genera *Haemobartonella* and *Eperythrozoon* to the genus *Mycoplasma* with descriptions of 'Candidatus *Mycoplasma haemofelis*', 'Candidatus *Mycoplasma haemomuris*', 'Candidatus *Mycoplasma haemosuis*' and 'Candidatus *Mycoplasma wenyonii*'. **International Journal of Systematic and**

Evolutionary Microbiology, v. 51, n. 1, p. 891-899, 2001.

NORMAN, G.R.; STREINER, D.L. **Bioestatística**. Madrid: Mosby & Doyma Libros, 1996.

OSTROWSKI, S.; VAN VUUREN, M.; LENAIN, D.M.; DURAND, A. A serologic survey of wild felids from Central West Saudi Arabia. **Journal of Wildlife Disease**, v. 39, n. 3, p. 696-701, 2003.

PEDERSEN, N.C.; HO E.W.; BROWN, M.L.; YAMAMOTO, J.K. Isolation of a T-lymphotropic virus from domestic cats with an immunodeficiency-like syndrome. **Science**, v. 235, n. 1, p. 790-793, 1987.

PEDROZA, L.M.; CHENCINER, N.; WAIN-HOBSON, S. Complex inpatient sequence variation in the V1 and V2 hypervariable regions of the HIV-1 gp 120 envelope sequence. **Virology**, v. 191, n. 1, p. 837-845, 1992.

PHIPPS, A.J.; HAYES, K.A.; AL-DUBAIB, M. et al. Inhibition of feline leukemia virus subgroup A infection by coinoculation with subgroup B. **Virology**, v. 277, n. 1, p. 40-47, 2000.

RECHE JUNIOR, A.; HAGIWARA, M.K.; LUCAS, S.R.R. Clinical study of acquired immunodeficiency syndrome in domestic cats in São Paulo. **Brazilian Journal of Veterinary Research Animal Science**, v. 34, n. 1, p.152-155, 1997.

REID, R.W.; BARR, M.C.; SCOTT, F.W. Retrospective serologic survey for the presence of feline immunodeficiency virus antibody: a comparison of ELISA and IFA techniques. **Cornell Veterinary**, v. 82, n. 1, p. 359-369, 1992.

REMYINGTON, J.S.; McLEOD, R.; THULLIEZ, P.; DESMONTS, G. **Toxoplasmosis**. In: Remington JS, Klein J, eds. Infectious diseases of the fetus and newborn infant. 5.ed. Philadelphia: WB Saunders, 2001. p. 205-346.

RIKIHISA, Y.; KAWAHARA, M.; WEN, B. Western immunoblot analysis of

Haemobartonella muris and comparison of 16 S r RNA gene sequences of *H. muris*, *H. felis* and *Eperythrozoon suis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 4, p. 823-829, 1997.

ROSA, J. A.; BUAINAIN, A.; NETO, F. M. B. *Toxoplasma gondii* em gatos da cidade de Araraquara-SP – Estudo sorológico e coproparasitológico. **Revista de Ciências Farmacológicas de São Paulo**, v. 8/9, n. 2, p. 105-111, 1986/1987.

ROSSI JR., J.L.; MOURA, C.A. Faça fácil, dardos e zarabatanas. **Clínica Veterinária**, v. 5, n. 28, p. 55-60, 2000.

SABIN, A.B. Toxoplasmic encephalitis in children. **Journal of American Medical Association**, v. 116, n. 1, p. 801-807, 1941.

SALATA, E.; YOSHIDA, E. L. A.; PEREIRA, E. A.; CORRÊA, F. M. A. Toxoplasmose em animais silvestres e domésticos da região de Botucatu, Estado de São Paulo, Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 27, n. 3, p. 20-22, 1985.

SHEETS, R.L.; PANDEY, R.; WHEN-CHENG, J.; ROY-BURMAN, P. Recombinant feline leukemia virus genes detected in naturally occurring feline lymphosarcomas. **Journal of Virology**, v. 67, n. 1, p. 3118-3125, 1993.

SHELTON, G.H.; WALTIER, R.M.; CONNOR, S.C.; GRANT, C.K. Prevalence of feline immunodeficiency virus and feline leukemia virus infection in pet's cats. **Journal American Animal Hospital Association**, v. 25, n. 1, p. 623-630, 1989.

SHELTON, G.H.; LINENBERGER, M.L.; ABKOWITZ, J.L. Hematologic abnormalities in cats seropositive for feline immunodeficiency virus. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, v. 199, n. 1, p. 1353-1357, 1991.

SILVA, J.C.R.; OGASSAWARA, S.; ADANIA, C.H. et al. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in captive neotropical felids from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 1, n. 102, p. 217-224, 2001

- SMALL, E.; RISTIC, M. Hemobartonelosis. In: HOLZWORTH, J. **Disease of the cats: Medicine & Surgery**. Philadelphia: W.B. Saunders, 1987. p. 301-308.
- SOGORB, F.; JAMRA, L. F.; GUIMARÃES, E. C.; DEANE, M. P. Toxoplasmose espontânea em animais domésticos e silvestres, em São Paulo. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 14/15, n. 5, p. 514-520, 1972.
- SOUZA, H.J.M.; TEIXEIRA, C.H.R.; GRAÇA, R.F.S. Estudo epidemiológico de infecções pelo vírus da leucemia e/ou imunodeficiência felina, em gatos domésticos do município do Rio de Janeiro. **Clínica Veterinária**, v. 7, n.36, p. 14-21, 2002.
- SPARGER, E.E. Current thoughts on feline immunodeficiency feline virus infection. **Veterinary Clinical of North America: Small Animal Practice**, v. 23, n. 1, p. 173, 1993.
- SPARKES, A. H. Toxoplasmosis en el gato y en el hombre. In: **Congreso de la Asociación Mundial de Medicina Veterinaria de pequeños animales**, 1998, Buenos Aires. Anais... Buenos Aires: Asociación Mundial de Medicina Veterinaria de Pequeños Animales, 1998. p. 415-417.
- SPLITTER, E.J.; CASTRO, E.R.; KANAWYER, W.L. Feline infectious anemia. **Veterinary Medicine**, v. 51, n. 1, p. 17-22, 1956.
- SWANGO, L.J. Moléstias virais felinas. In: ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. **Tratado de Medicina Veterinária I: moléstia do cão e do gato**. 4. ed. São Paulo: Monole, 1997. p. 573-631.
- TAILOR, C.S.; NOURI, A.; KABAT, D.A. A putative cell surface receptor for anemia-inducing feline leukemia virus subgroup C is a member of a transporter superfamily. **Journal of Virology**, v. 73, n. 1, p. 6500-6505, 1999.
- TANIWAKI, S.A.; ARAÚJO, JR.; LARA, V.M.: Estudo da frequência da infecção pelo vírus da imunodeficiência felina pela *nested-PCR*. In: MOSTRA CIENTÍFICA DA FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA DA UNESP, 6º ANO, São Paulo, 2002. p. 4-5.
- TANG, H.; KUNHEN, K.L.; WONG-STAAAL, F. Lentivirus replication and regulation. **Annual Review of Genetics**, v. 33, n. 1, p. 133-170, 1999.
- TENORIO, A.P.; FRANTI, C.E.; MADEWELL, B.R.; PEDERSEN, N.C. Chronic oral infections of cats and their relationship to persistent oral carriage of feline calicivirus, immunodeficiency, or leukemia viruses. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 29, n. 1, p. 1-14, 1998.
- TOCHIKURA, T.S.; HAYES, K.A.; CHENEY, C.M. et al. *In vitro* replication and cytopathogenicity of the feline immunodeficiency virus for feline T4 thymic lymphoma 3201 cells. **Virology**, v. 179, n. 1, p. 429-437, 1990.
- VIANA, F.A.B. **Guia terapêutico veterinário**. Belo Horizonte: CEM, 2003. p. 165 e 198.
- VOSS, E.W. **Fluorescein hapten an immunological probe**. Florida: CRc, 1984. p. 193.
- YAMAMOTO, J.K.; SPARGER, E.; HO, E.W. et al. Pathogenesis of experimentally induced feline immunodeficiency virus infection in cats. **American Journal Veterinary Research**, v. 49, n. 1, p. 1246, 1988.
- YAMAMOTO, J.K.; HANSEN, H.; HO, E.W. et al. Epidemiology and clinical aspects of feline of feline immunodeficiency virus infection in cats from the continental United States and Canada and possible mode of transmission. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, v. 194, n. 1, p. 213, 1989.
- WASMOEN, T.; ARMIGER-LUHMANN, S.; EGAN, C. et al. Transmission of feline immunodeficiency virus infected queens to kittens. **Veterinary Immunology and**

Immunopathology, v. 35, n. 1, p. 83-93, 1992.

WESTFALL, D.S.; JENSEN, W.A.; REAGAN, W.J. et al. Inoculation of two genotypes of *Haemobartonella felis* (California and Ohio variants) to induce infection in cats and the response to treatment with azithromycin. **American Journal of Veterinary Research**, v. 62, n. 1, p. 687-681, 2001.

WOODS, J.E.; BREWER, M.M.; HAWLEY, J.R. et al. Evaluation of experimental

transmission of Candidatus *Mycoplasma haemominutum* and *Mycoplasma haemofelis* by *Ctenocephalides felis* to cats. **American Journal of Veterinary Research**, v. 66, n. 6, p.1008-1012, 2005.

Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTV>> Acesso em 20 de maio de 2004. **National Center for Biotechnology Information**

<<http://www.maad.med.cornell.edu>> Acesso em 25 de setembro de 2005. **Cornell University**.

ANEXO

N° ANIMAL:		DATA:		LOCAL:	
I D A D E			S E X O		
< 6 MESES		> 6 MESES		MACHO	
				FÊMEA	
P R E S E N Ç A E C T O P A R A S I T A S					
PULGAS		DISCRETO	MODERADO	INTENSO	OBS
CARRAPATOS		DISCRETO	MODERADO	INTENSO	OBS
S I N A I S C L I N I C O S					
		DISCRETO	MODERADO	INTENSO	OBS
PALIDEZ MUCOSA OCULAR					
HIPERÊMIA MUCOSA OCULAR					
↑ LINFONODOS POPLÍTEO					
↑ LINFONODOS CERVICAIS SUPERF.					
↑ LINFONODOS SUB MANDIBULAR					
EMAGRECIMENTO					
LESÕES DERMATOLÓGICAS					
PRESENÇA ECTOPARASITAS					
Outros:					