

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
COLEGIADO DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**DIAGNÓSTICO MOLECULAR DA LEUCEMIA VIRAL FELINA POR MEIO DA
UTILIZAÇÃO DE *SWAB* ORAL, CONJUNTIVAL E RETAL**

RAPHAEL MATTOSO VICTOR

Belo Horizonte
Escola de Veterinária – UFMG
2019

Raphael Mattoso Victor

**DIAGNÓSTICO MOLECULAR DA LEUCEMIA VIRAL FELINA POR MEIO DA
UTILIZAÇÃO DE *SWAB* ORAL, CONJUNTIVAL E RETAL**

Dissertação apresentada na Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal

Área de Concentração: Medicina Veterinária Preventiva
Orientador: Prof. Dr. Jenner Karlisson Pimenta dos Reis

Belo Horizonte
Escola de Veterinária – UFMG
2019

DEDICATÓRIA

A minha mãe, que sempre me inspirou e me ensinou com seu exemplo o que é ter garra e lutar por aqueles que amamos.

AGRADECIMENTOS

A Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais por oferecer-me o caminho e os meios para eu chegar até aqui.

Aos gatos, cujo amor pela espécie me motivou alçar novos voos!

A meu orientador, Professor Jenner, pela orientação sempre atenciosa e precisa. Sua competência como professor e pesquisador foram inspiração para mim durante esse período. Agradeço imensamente pela oportunidade oferecida e pela ajuda constante nesses passos iniciais de uma futura carreira como docente. Sou grato também à sua paciência inesgotável com meu jeito meio enrolado de ser em relação a prazos e ao querer fazer tudo ao mesmo tempo. Seu carinho com os orientados e sua preocupação em nos manter unidos também fora dos limites do laboratório foram fundamentais para que eu passasse por esse processo de forma equilibrada e saudável!

A minha mãe, Eliane, por me inspirar a estudar e a ensinar desde meus dias mais tenros. Sua garra como mãe e como mulher enchem meu coração de orgulho! Sou grato por seu amor incondicional! Além disso, ver seu carinho e dedicação com cada aluno que “passou por sua mão” me faz cada dia mais querer seguir seus passos. A minha irmã, Chelline, por ser minha melhor amiga e meu porto seguro ao longo de toda a vida. Ao meu irmão Pedro, pela amizade e pelo carinho, além do senso de responsabilidade que despertou em mim.

A meu companheiro de jornada, André Luiz, por ser sempre o primeiro a me incentivar e apoiar a seguir à frente. Seu amor e seu apoio constante permitiram com que eu me dedicasse à minha maior paixão: os animais. Sem sua presença em minha vida, eu hoje nada seria! Muito obrigado!

A meu amado “filho” felino, Tobias, por fazer desse amor, que ultrapassa as barreiras da vida e da morte, o divisor de águas que transformou minha profissão na minha maior paixão! A Phoebe, Amélie, Armani e Morgana, meu outros “filhos” pelo amor incondicional e mais puro que existe. A vida se torna mais fácil e muito mais completa na companhia de vocês.

Aos irmãos que a vida me deu, Ana Luísa Miranda e Luan Gavião, por serem meu porto seguro e fonte inesgotável de carinho e atenção. Obrigado por me ensinarem tanto quando eu ainda engatinhava nessa nossa profissão! A distância pode até limitar nosso convívio diário, mas jamais apagará esse amor e carinho que sinto por vocês.

A Ana Scott, Camila Carvalho e Joilson Reis, também irmãos adquiridos ao longo do caminho, que na sinceridade da amizade, me mostraram o que é amar e ser feliz com o sucesso do outro. O suporte, puxões de orelha e carinho recebidos ao longo desses quase nove anos de convívio moldaram a pessoa que sou hoje.

A Mariana Mamedes, irmã, amiga e companheira diária de inúmeros cafezinhos, que com sua delicadeza de mula sempre esteve por perto para dar seus conselhos e me ouvir! Muito obrigado!

A Juliana Bicalho por ter sido mais que uma amiga ao longo desses dois últimos anos. À sua mentoria, dedicação e ao seu coração gigante me faltam palavras para descrever tamanha gratidão!

A Manuela Bamberg, amiga e parceira de pesquisa, que tanto me ensinou. Obrigado por enfrentar essa missão ao meu lado e por me apresentar o mundo adorável dos *tilelês*.

Ao grupo “Nós em Minas”, Ana Fraiha, Ana Scott, Bruna Sette, Celina Alves, Fernanda Tavares, Isabela Melo, Joilson, Lucas Braga, Luiza Dayrell, Manuela Bamberg, Maria Gabriela, Marília Gabriela, Nathália Dorneles, Tayanne Gouveia e William Magalhães, inicialmente colegas de turma, mas agora amigos para toda uma a vida! Obrigado por estarem sempre por perto e juntarem duas paixões comer e “dar pásas” em um único evento: “Gourmetizando”!!

Ao “Grupo da Paróquia”: Andresa, Andressa, Camila, Mariana e Joilson por me fazerem rir e por passarem comigo pelos mesmos perrengues!

Aos irmãos Retrolabirideos, e amigos do coração, que sempre estiveram presentes na hora certa para dar aquela ajuda: Breno Samuel, Bruna Bueno, Cláudia Fideles, Emília Delarmelina, Francielli Martins, Gabriel Lopes, Juliana Bicalho, Mariana Salles, Priscilla Vasconcelos, Rebeca Falcão e Telissa Kassar. A amizade e o sorriso de vocês sempre foram uma das maiores recompensas de fazer parte dessa família.

A minha mãe gateira, Tathiana Mourão dos Anjos, que além de ser o anjo na vida dessa espécie tão negligenciada, foi a primeira a abrir as portas e me oferecer a oportunidade de conhecer a Medicina Felina. Você é também responsável por eu estar aqui!

A minha grande amiga Cássia Gomes, obrigado por todo carinho e por me proporcionar tantas oportunidades de crescimento!

A minha família gateira: Tia (Adriane), Andressa, Manu, Nath Heleno, Nina e Vitor agradeço imensamente por estarem ao meu lado na realização de um sonho: melhorar a vida dos gatos levando o conhecimento a todos através do GDFel! Vocês são demais!

Às professoras Maristela Palhares e Renata Maranhão por me proporcionarem tamanha oportunidade de aprendizado e amadurecimento profissional.

A todos os amigos que fiz ao longo da minha vida como pós-graduando e que fizeram o diferencial no meu aprendizado! Muito obrigado!

Aos técnicos administrativos do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, que tanto nos auxiliam e nos socorrem, mesmo que indiretamente, o meu muito obrigado!

Aos queridos tutores que gentilmente cederam seus animais tão amados para realização deste estudo.

*“Não são nossas habilidades que mostram o que realmente somos.
São nossas escolhas.”
Albus Dumbledore
(J. K. Rowling)*

SUMÁRIO

RESUMO	10
ABSTRACT	10
1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	13
3 REVISÃO DE LITERATURA	13
3.1 O AGENTE DA LEUCEMIA VIRAL FELINA	13
3.2 EPIDEMIOLOGIA DA LEUCEMIA VIRAL FELINA.....	15
3.3 PATOGENIA.....	17
3.3.1 Estadiamento da Infecção pelo Feline Leukemia Vírus.....	17
3.3.1.1 Infecção Abortiva.....	18
3.3.1.2 Infecção Progressiva	18
3.3.1.3 Infecção Regressiva.....	18
3.3.1.4 Infecção Focal ou Atípica.....	19
3.4 DIAGNÓSTICO	19
3.4.1 Imunocromatografia e Ensaio Imunoenzimáticos.....	19
3.4.2 Imunofluorescência (IFA – <i>Immunofluorescent Antibody</i>)	21
3.4.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	21
3.4.4 Isolamento Viral	22
3.4.5 Interferência Viral.....	22
4. MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1 ANIMAIS	23
4.2 COLETA DE AMOSTRAS	23
4.2.1 Amostras de Sangue e Triagem	23
4.2.2 Swab Conjuntival (SC), Oral (SO) e Retal (SR)	24
4.3 EXTRAÇÃO DE DNA	24
4.3.1 Amostras de Sangue	24
4.3.2 Amostras de <i>Swab</i>	25
4.4 Detecção do DNA proviral do FeLV por PCR.....	25
4.4.1 GAPDH como verificador da qualidade da Extração de DNA.....	25
4.4.2 Identificação Molecular do DNA Proviral do FeLV	25
4.5 SEQUENCIAMENTO	26
4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	27
4.6.1 Ocorrência de FeLV na População Avaliada	27
4.6.2 Sensibilidade e Especificidade	27
4.6.3 Coeficiente Kappa.....	27
4.6.4 Acurácia	28
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
5.1 AMPLIFICAÇÃO DO GENE NORMALIZADOR GAPDH E DO GENE gag DO FeLV	29
5.2 IMUNOCROMATOGRAFIA E ESTADIAMENTO DA INFECÇÃO	31
5.3 SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DA PCR DE AMOSTRAS OBTIDAS POR SWAB.....	33
5.4 SEQUENCIAMENTO	34
5.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	34
5.5.1 Ocorrência do FeLV na População Avaliada	34
5.5.2 Resultados Discordantes entre PCR-SO, PCR-SR e PCR-SC em Relação à PCR de Capa Leucocitária.....	35
5.5.3 Concordância Entre os Testes	36
6 CONCLUSÕES	38

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	39
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA.....	40
9 ANEXOS.....	46
9.1 PROTOCOLO DE ACEITE – COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	46

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura genômica dos FeLVs descritos até o momento. O enFeLV é o mais distante geneticamente do FeLV-A, com diferenças em todos os genes. FeLV-B é formado pela recombinação do gene env-LTR do enFeLV com o FeLV-A. FeLV-C, T e TG35 possuem inserções, substituições e deleções do genoma original (FeLV-A). Fonte: modificado de Chiu et al. (2018).	16
Figura 2 - Fluxograma com as etapas de processamento. Após a coleta de sangue, foram realizadas as coletas dos <i>swab</i> . Imediatamente após a coleta, o sangue foi centrifugado para a segregação do plasma e das hemácias. Três gotas do plasma foram utilizadas para a execução do teste rápido, conforme orientação do fabricante. A capa leucocitária presente sobre a camada de hemácias foi coletada para posterior extração do DNA e PCR. Os <i>swab</i> coletados, foram colocados em microtubos de 1,5mL contendo 400uL de PBS. Foram submetidos a centrifugação e a haste descartada. 200uL do material presente em cada tubo foram utilizados para a extração de DNA e PCR conforme descritos nos itens 3.2; 3.3 e 3.4.	24
Figura 3 - Curva de tempos e temperatura para amplificação do fragmento de 450pb do gene <i>gag</i> do FeLV, conforme padronizado por Finoketti et al. (2011). Stage 1: Tempo e temperatura de Inicialização (ativação da enzima). Stage 2: 35 ciclos das seguintes etapas A: binômio tempo x temperatura para desnaturação; B: binômio tempo x temperatura para anelamento; A: binômio tempo x temperatura para extensão/alongamento. Stage 3: binômio tempo x temperatura para alongamento final.	26
Figura 4 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% apresentando a amplificação do gene normalizador GAPDH, de 709pb, em amostras obtidas por <i>swab</i> retal. Canaleta 01: marcador de peso molecular (100pb); canaletas 02-08: amostras positivas; canaletas 09-10: amostras negativas; canaleta 11: Controle branco (CB) (água ultrapura); canaleta 12: controle positivo (CP).	30
Figura 5 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% apresentando a amplificação do gene <i>gag</i> do FeLV, em altura equivalente a 450pb, de DNA extraído de capa leucocitária . Canaleta 13: marcador de peso molecular (100pb); Canaleta 01, 02, 05, 08 e 11: amostras positivas; canaleta 03, 04, 06, 07, 09 e 10: amostras negativas; canaleta 12: Controle negativo (CN); canaleta 14: controle positivo (CP).	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Estadiamento da infecção dos animais positivos na PCR CL.	31
Tabela 2 – Formas de apresentação da infecção na população avaliada (n = 145).....	33
Tabela 3 – Concordância geral dos resultados entre PCR de <i>Swab</i> oral e o teste de referência (PCR Capa leucocitária).....	33
Tabela 4 – Concordância geral dos resultados entre PCR de <i>swab</i> conjuntival e o teste de referência (PCR Capa leucocitária).....	34
Tabela 5 – Concordância geral entre os resultados da PCR de <i>Swab</i> Retal e do teste de referência (PCR Capa leucocitária).....	34
Tabela 6 – Sensibilidade e Especificidade de cada teste.....	34
Tabela 7 – Ocorrência de FeLV na população estudada de acordo com o método utilizado	35
Tabela 8 – Resultados discordantes entre PCR SO, PCR SR e/ou PCR SC em relação à PCR CL.....	35
Tabela 9 – Concordância de cada teste em relação à PCR CL estratificada por fase de infecção	36
Tabela 10 – Coeficiente Kappa entre PCR de Capa Leucocitária e cada metodologia avaliada	37

Tabela 11 – Acurácia geral de cada teste em relação à PCR de Capa Leucocitária.....	37
--	----

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Intervalos de valores possíveis para o coeficiente Kappa e suas interpretações conforme Landis e Koch (1977),	27
---	----

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

CL –	Capa de Leucócitos
ELISA –	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática
enFeLV –	FeLV Endógeno
FeLV –	Feline leukemia virus
FIV –	Feline Immunodeficiency Virus
GAPDH –	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
IFA –	Imunofluorescence Antibody
NCBI -	National Center for Biotechnology Information
p27 –	Proteína de capsídeo do Feline leukemia virus p27
PBS –	Phosphate-buffered saline
PCR –	Reação em Cadeia da Polimerase
SC –	<i>Swab</i> Conjuntival
SO –	<i>Swab</i> Oral
SR –	<i>Swab</i> Retal

RESUMO

A infecção pelo *Feline leukemia virus* (FeLV), agente causador da Leucemia Viral Felina, pode levar a neoplasias fatais, doenças degenerativas do sistema hematopoiético e imunossupressão. O contato próximo favorece a transmissão do FeLV entre gatos que compartilham o mesmo espaço e instalações. Para a execução de testes diagnósticos, atualmente, o sangue e seus derivados são as principais amostras biológicas utilizadas. A coleta de sangue é geralmente por punção venosa, exigindo contenção física ou química do animal. Tornar o diagnóstico das retrovirose felinas mais prático e fácil é crucial para reduzir os impactos negativos na saúde animal e aumentar o número de animais testados. O objetivo deste estudo foi avaliar o uso de amostras de *swab* de mucosa oral, conjuntival e retal, no diagnóstico molecular da infecção pelo FeLV. Além do sangue total utilizado como amostra de referência, foram coletados de cada animal dois *swab* orais, dois conjuntivais e um retal. Todas as amostras séricas foram submetidas a testes imunoenzimáticos e à reação em cadeia da polimerase (PCR) para a amplificação do fragmento do gene *gag* do DNA proviral. A mesma PCR também foi realizada em todas as amostras obtidas por *swab*. Foram selecionados para o experimento 145 animais de forma aleatória. A ocorrência para o FeLV na população estudada foi de 49,66% por diagnóstico molecular em capa leucocitária, e 22,76% por identificação da antigenemia (p27 circulante). A acurácia para cada metodologia avaliada foi igual a 91,72% para a PCR de amostras obtidas por *swab* oral; 91,23% para as de *swab* conjuntival e de 85,50% para as obtidas por *swab* retal. A sensibilidade e a especificidade de cada PCR avaliada em relação à PCR de referência foram, respectivamente, 86,11% e 97,26% para a PCR de *swab* oral; 90% e 92,59% para a PCR de *swab* conjuntival; e 74,24% e 95,77% para a PCR de *swab* retal. Os valores do coeficiente Kappa para PCR de *Swab* Oral, PCR de *Swab* Conjuntival e PCR de *Swab* Retal foram, respectivamente, 0,89; 0,89 e 0,82. A obtenção de amostras por meio de *swab* de mucosas oral, conjuntival e retal, para o diagnóstico molecular da infecção pelo FeLV, constitui uma excelente alternativa à venopunção, especialmente em locais onde a presença de profissionais treinados e habilitados é limitada ou inexistente, ou em abrigos onde a população de felinos é grande. Além disso, trata-se de uma metodologia mais rápida, menos laboriosa, de menor custo e melhor aceitação pelo animal. Outro achado relevante desse estudo foi a detecção do DNA proviral do FeLV em células das mucosas oral e conjuntival, possibilitando o diagnóstico de animais em fase regressiva da infecção.

Palavras-chaves: FeLV; FAIDS; oncornavirus; gammaretrovirus; amostra de mucosas;

ABSTRACT

Feline leukemia virus (FeLV) infection can lead to fatal neoplasms, degenerative diseases of the hematopoietic system and immunosuppression. FeLV transmission is favored by close contact among cats that share the same space and facilities. To perform diagnostic tests, blood and its derivatives are the main specimens used currently. Blood collection, usually by venipuncture, requires physical or chemical restraint. Making diagnoses of feline retroviruses more practical and easier is crucial to reducing negative impacts on the cat's health and will allow for an increased number of animals to be tested. The aim of this study was to evaluate the use of oral, conjunctival and rectal swab samples for the molecular diagnosis of FeLV infection. In addition to the whole blood used as reference sample, two oral swab, two conjunctival swab and one rectal swab were collected from each animal. All serum samples were submitted to immunochromatographic and PCR tests for amplification of the proviral DNA gag gene fragment. The same PCR was also performed on all swab samples. A total of 145 random animals were selected for the experiment. The occurrence of FeLV in the studied population was 49.66% by molecular diagnosis in peripheral blood mononuclear cell samples and 22.76% through the identification of the antigenemia (p27). The accuracy for each methodology evaluated was 91.72% for the PCR of samples obtained by oral swabbing; 91.23% for those from conjunctival swab and 85.50% for those obtained by rectal swabbing. The sensitivity and specificity of each PCR evaluated in relation to the reference PCR were, respectively, 86.11% and 97.26% for the oral swab PCR; 90% and 92.59% for conjunctival swab PCR; and 74.24% and 95.77% for rectal swab PCR. Kappa values for oral swab PCR, conjunctival swab PCR and rectal swab PCR were 0.89, 0.89 and 0.82, respectively. Sampling using oral, conjunctival and rectal mucosal

swabs for the molecular diagnosis of FeLV infection is an excellent alternative to the venipuncture, especially in places where the presence of trained and qualified professionals is limited or not available, or even for shelters with a large feline population. In addition, the methodology is faster, less laborious, less expensive and well accepted by the animal. Another relevant finding of this study was the detection of FeLV proviral DNA in oral and conjunctival mucosal cells, allowing the diagnosis of animals in the regressive phase of infection.

Keywords: FeLV; FAIDS; oncornaviruses; Gammaretrovirus; membrane swabbing;

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas houve um grande avanço da medicina felina em todo o mundo. O gato se tornou o animal mais popular nos Estados Unidos e no norte europeu (Rodan, 2010) e no Brasil, o número de felinos supera 22,1 milhões. Estima-se que a partir de 2023, a população de gatos será maior do que a de cães (ABINPET, 2013). Entretanto, muitos pacientes felinos não recebem cuidados veterinários regulares, e cerca de 72% dos gatos visitam o veterinário em períodos de intervalos superiores a um ano (Rodan, 2010). O principal motivo para isso, é o desafio em levar o gato ao estabelecimento veterinário, como ele reage na prática veterinária e como o ele é tratado pelos próprios profissionais. Embora já exista uma preocupação entre os clínicos de felinos em estabelecer práticas amigáveis ao gato, denominadas de *Cat Friendly Practices*, muitos gatos ainda não têm suas características inerentes da espécie respeitadas e são tratados como “cães menores”. Isso afeta diretamente sua saúde e seu bem-estar.

A contenção de gatos durante o atendimento veterinário ajuda a prevenir lesões por mordedura e arranhões, proteger contra doenças zoonóticas, como por exemplo, a esporotricose e a raiva, e limitar a movimentação do paciente durante procedimentos veterinários (Rodan, 2010). No entanto, apesar de importante para a segurança, a contenção também aumenta o medo que o paciente sente naquele momento, tornando-os ainda mais agressivos. Esses animais podem experimentar medo e ansiedade em decorrência de uma ameaça real, ou mesmo, devido a uma resposta excessiva quando pouco ou nenhum perigo real está presente (Bremner *et al.*, 1996)

Os estímulos aversivos têm consequências negativas sobre o felino. O estresse em animais de companhia, principalmente no gato, quando é intenso ou duradouro o suficiente para exceder a capacidade de adaptação do indivíduo, desencadeia efeito negativo no seu bem-estar (Moberg, 2009). Além disso, pode levar a alterações comportamentais indesejadas. Uma das consequências da resposta ao estresse é a supressão da função do sistema imunológico e o desenvolvimento de uma nova infecção ou a reativação de uma anterior (Griffin, 1989). Segundo Tanaka *et al.* (2012), gatos com altos níveis de estresse são quase cinco vezes mais propensos a desenvolverem infecção do trato respiratório superior do que gatos com níveis mais baixos de estresse. O estresse tem sido associado a vários problemas gastrointestinais, como diarreia e vômito (Enck e Holtmann, 1992; Stella *et al.*, 2011). Acredita-se que o estresse pode até mesmo alterar a integridade da barreira intestinal (Lambert, 2009), o que, por sua vez, causa um aumento em sua permeabilidade e uma reação inflamatória local. Tais efeitos exercem também papel importante no desenvolvimento da cistite intersticial felina, diagnóstico mais comum em gatos com doença do trato urinário inferior (Cameron *et al.*, 2004; Buffington, 2011). Uma das mais graves mudanças comportamentais relacionadas ao estresse em gatos é a anorexia, que pode levar a um quadro de lipidose hepática potencialmente fatal. A lipidose hepática é particularmente mais comum em gatos com sobrepeso que param de comer como resposta ao estresse (Armstrong e Blanchard, 2009).

Além dos efeitos diretos causados pela ação dos hormônios do estresse e das alterações fisiológicas sobre a saúde do animal, o médico veterinário se depara ainda com a dificuldade no manejo do paciente. A coleta de sangue por venopunção requer uma contenção segura e firme do paciente a fim de garantir a segurança tanto do animal quanto da equipe médica. No entanto, as respostas de muitos indivíduos quando em situação de luta ou fuga, fazem da coleta de sangue uma atividade difícil de ser executada, exigindo capacitação prática e também, paciência por parte da equipe médica.

Conhecer o *status* infeccioso do gato para as retrovírus felinas é crucial para manejo e tratamento adequados das mais variadas afecções (Little, 2011b). O agente causador da leucemia viral felina, o *Feline leukemia virus* (FeLV), tem como seu principal meio de transmissão a saliva (Gomes-Keller *et al.*, 2006; Cattori *et al.*, 2009), mas grande quantidade de vírus pode ser encontrada no sangue e em outras secreções corporais de animais com a infecção progressiva (Francis *et al.* 1977; Gomes-Keller, Tandon, *et al.*, 2006; Cattori *et al.*, 2009; Gomes-Keller *et al.*, 2009). O simples contato íntimo, como o comportamento de lambedura mútua, o compartilhamento de vasilhas e as brigas, favorecem a transmissão do vírus entre os gatos que dividem o mesmo espaço e instalações (Caney, 2000; Francis *et al.*, 1977).

Para a realização dos testes de diagnóstico laboratoriais, atualmente, o sangue e seus derivados são as principais amostras biológicas utilizadas. A coleta geralmente ocorre por venopunção, requerendo contenção física ou química dos animais. Facilitar o acesso ao diagnóstico para as retrovíroses felinas se torna essencial não apenas para reduzir os impactos sobre a saúde do animal, mas também como forma de ampliar o número de animais testados e conseqüentemente, proporcionar o manejo sanitário condizente com cada perfil. Em longo prazo, o manejo adequado baseado na segregação dos animais promoverá uma redução na quantidade de animais infectados.

A coleta de amostras por meio de *swab* no paciente felino é relativamente mais segura, menos invasiva, menos estressante, de menor custo e mais fácil de se executar quando comparada à coleta de sangue por venopunção (Cattori *et al.*, 2008; Gomes-Keller *et al.*, 2009; Gomes-Keller; Tandon *et al.*, 2006; Westman *et al.*, 2015; Westman; Malik; Hall; Sheehy *et al.*, 2016). Muitos procedimentos de coleta de sangue precisam ser realizados sob sedação do paciente (Westman; Malik; Hall e Norris, 2016), implicando em gastos extras aos tutores e riscos à saúde do animal.

2 OBJETIVOS

Como objetivo geral, avaliou-se o uso de amostras obtidas por *swab* das mucosas oral, conjuntival e retal, no diagnóstico molecular da infecção pelo FeLV, buscando por meio de medidas menos invasivas e menos laboriosas, fornecer bases experimentais que levem a uma facilitação e ampliação do número de animais testados para a Leucemia Viral Felina.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 O AGENTE DA LEUCEMIA VIRAL FELINA

O *Feline leukemia virus* (FeLV), causador da Leucemia Viral Felina, é um gammaretrovírus, pertencente à família *Retroviridae*, que infecta gatos domésticos e outras espécies de pequenos felídeos. O FeLV é um vírus de interesse não apenas veterinário, mas também para a medicina humana pois é um importante modelo para estudos de tumores com etiologia viral e doenças imunossupressoras, como a AIDS (Miyazawa, 2002; Helfer-Hungerbuehler, *et al.*, 2015). Infecções pelo FeLV podem desencadear neoplasias fatais, doenças degenerativas do sistema hematopoiético e depressão do sistema imune (Hofmann-Lehmann *et al.*, 2008). Assim como os demais retrovírus, o FeLV é um vírus envelopado que possui duas fitas simples de RNA e a enzima transcriptase reversa (RT). Sua estrutura genômica possui três regiões gênicas, *gag*, *pol* e *env*, cercadas por sequências reguladoras não-traduzidas, conhecidas como LTR. O gene *gag* é responsável por codificar antígenos específicos do FeLV e importantes proteínas virais, como a proteína de capsídeo p27. O gene *pol* é responsável por codificar as enzimas protease (p14), integrase (p46) e a transcriptase reversa (p80), enquanto o gene *env* codifica as proteínas de envelope, como a p15E, que possui papel importante na atividade imunossupressora do FeLV. (Chiu *et al.*, 2018; Miyazawa, 2002; Sykes e Hartmann, 2013). No primeiro estágio replicativo, a RT transcreve RNA viral em DNA de dupla fita. Uma vez que a cópia foi sintetizada, ela é integrada ao genoma da célula alvo do hospedeiro, pela ação da enzima integrase, e passa a ser denominada provírus. Esse provírus é capaz de permanecer no genoma durante toda a vida da célula. Em algum momento, induzido por mecanismos ainda não bem conhecidos, há a expressão de RNAs mensageiros para a síntese das proteínas do vírion e RNA genômico, levando a produção de novas partículas com conseqüente liberação e a infecção de novas células (Willett e Hosie, 2013). A progressão da infecção pelo FeLV é mais rápida e mais patogênica do que a infecção causada pelo *Feline immunodeficiency virus* (FIV), um outro retrovírus que infecta a espécie felina.

O FeLV foi o primeiro retrovírus de felinos identificado (Jarrett *et al.*, 1964) sendo associado à diversas doenças fatais, incluindo neoplasias, desordens hematológicas e imunossupressão (Gomes-Keller *et al.*, 2009; Sykes e Hartmann, 2013). A descoberta desse vírus forneceu material de estudo para melhor compreensão da oncogênese ligada às infecções virais. Entretanto, a patologia do FeLV ainda é objeto de estudo. Rojko *et al.*, (1979) mostraram que o vírus infecta inicialmente tecidos linfóides locais, linfócitos e monócitos, causando uma viremia primária associada às células, que expande a infecção para todo tecido linfoide.

Além da existência do FeLV transmissível, a maioria dos gatos domésticos possui integrado ao seu genoma o FeLV endógeno (enFeLV). Retrovírus endógenos (ERVs, do inglês *Endogenous Retroviruses*) são abrigados por muitos animais (Tandon *et al.*, 2008; Powers *et al.*, 2018). A maioria dos ERVs contém mutações deletérias, grandes deleções, e inserções de elementos repetitivos que os tornam incapazes de produzir partículas virais infecciosas, mas esses provírus muitas vezes são transcritos e produzem produtos gênicos funcionais (Boeke e Stoye, 1997). No caso dos felinos, acredita-se que a colonização de células germinativa por enFeLV tenha ocorrido em um ancestral da linhagem de gatos domésticos, antes da divergência de qualquer uma das ramificações que levaram às espécies existentes atualmente (Polani *et al.*, 2010). Especula-se que o enFeLV tenha se originado há milhares de anos em decorrência da predação de ratos portadores do vírus da leucemia murina (MuLV, *Murine leukemia virus*) que foi capaz de incorporar seu genoma às células germinativas do predador. O MuLV foi então herdado por todos os descendentes felinos (Benveniste, 1975). Apesar de estar presente em todas as células dos gatos, com pequenas variações individuais, os vírus “endogenizados” podem adquirir mutações que prejudicam a replicação viral produtiva, mas permanecem como elementos endógenos fixados no genoma do hospedeiro, que é transmitido para as próximas gerações (Boeke e Stoye, 1997; Powers *et al.*, 2018)

Embora não ocorra a transmissão horizontal do enFeLV e essas unidades gênicas não sejam capazes de produzir infecção no hospedeiro, ele é extremamente importante para a biologia do FeLV exógeno. A carga viral de enFeLV está diretamente relacionada a susceptibilidade. Tandon *et al.* (2008) observaram que os gatos com altas cargas de enFeLV tinham menor probabilidade de se tornarem antígenêmicos persistentes, ou seja, quando comparado a gatos com baixa carga de enFeLV. Assim, os retrovírus endógenos podem ter múltiplos pontos de interferência contra um retrovírus exógeno relacionado, resultando em truncamento da replicação viral exógena (Powers *et al.*, 2018)

Seis subgrupos diferentes de FeLV exógenos foram associados às manifestações clínicas distintas. Inicialmente, foram identificados o FeLV-A, B e C, baseado em testes de interferência viral (Sarma e Log, 1973; Miyazawa, 2002). Posteriormente, descobriu-se uma nova variante oriunda de uma quimera viral, associada à AIDS felina, o FeLV-T, e mais recentemente, dois novos subtipos foram identificados, o FeLV-D (Anai *et al.*, 2012) e o FeLV-TG35 (Mikaye *et al.*, 2016).

O FeLV-A é o grupo geneticamente mais distante do enFeLV (Chiu *et al.*, 2018), e apesar de ser o subtipo mais comum, é o menos patogênico de todos. O subtipo A está ligado à transmissão horizontal e é a origem de todas as outras variações patogênicas (Miyazawa, 2002). Ele tem sido associado com anemias macrocíticas, com linfomas e com imunossupressão (Hartmann, 2012b; Sykes e Hartmann, 2013; Willett e Hosie, 2013). Quando em um animal ocorre a recombinação do FeLV-A com a região *env* do enFeLV, tem-se origem o FeLV-B (Miyazawa, 2002; Tandon *et al.*, 2008). Trata-se de um subtipo com características tumorigênicas, sendo comumente encontrado em gatos leucêmicos. O FeLV-B é pouco infeccioso por si só, podendo ser isolado de 30% a 60% dos gatos infectados com FeLV, mas apenas na presença de FeLV-A (Phipps *et al.*, 2000; Sarma e Log, 1973). O subtipo FeLV-C é raro, com apenas 1% dos gatos FeLV positivos hospedando esse subtipo (Jarrett *et al.*, 1978). Está associado ao desenvolvimento de anemias aplásicas. O FeLV-C é um subtipo derivado de mutações do gene *env* do subtipo A (Hoover *et al.*, 1974; Mackey *et al.*, 1975; Riedel *et al.*, 1986, Stewart *et al.* 2012). O FeLV-T, uma variante viral com tropismo por células T, é conhecido por induzir nos animais positivos a AIDS Felina (FAIDS) (Anderson *et al.*, 2000; Hoover *et al.*, 1987; Overbaugh *et al.*, 1988) semelhante ao que ocorre na fase terminal de infecção pelo FIV. Ele é um subtipo que tem origem a partir de duas variantes do FeLV-A, uma com a inserção de

quatro e outra com a troca de seis aminoácidos no segmento do gene *env*. O sequenciamento de nucleotídeos de isolados de um gato experimentalmente infectado revelou que o FeLV-T é uma quimera dessas duas variantes (Overbaugh *et al.*, 1988). Os dois subtipos mais recentemente identificados, o FeLV-D e o FeLV-TG35, ainda carecem de mais estudos. No entanto, sabe-se que o FeLV-D tem sua origem em um outro retrovírus endógeno de gatos domésticos, chamado ERV-DC (*endogenous retrovirus of domestic cats*), que é diferente do enFeLV (Anai *et al.*, 2012). A transdução do gene *env* do ERV-DC em FeLV produz, então, o subtipo D (Ito *et al.*, 2013). Por sua vez, o FeLV-TG35 foi identificado em apenas um único animal no Japão (Mikaye *et al.*, 2016). Ao sequenciar a porção *env* do FeLV-A, os autores verificaram a substituição de sete aminoácidos e duas inserções de aminoácidos em regiões variáveis. Apesar da semelhança com FeLV-A, os ensaios de interferência confirmaram que o TG35 *env* teve como alvo um receptor diferente, constituindo potencialmente um novo subgrupo (Mikaye *et al.*, 2016). A figura 1, adaptada de CHIU *et al.* 2018, ilustra o mapa genômico do enFeLV e dos diferentes subgrupos do FeLV.

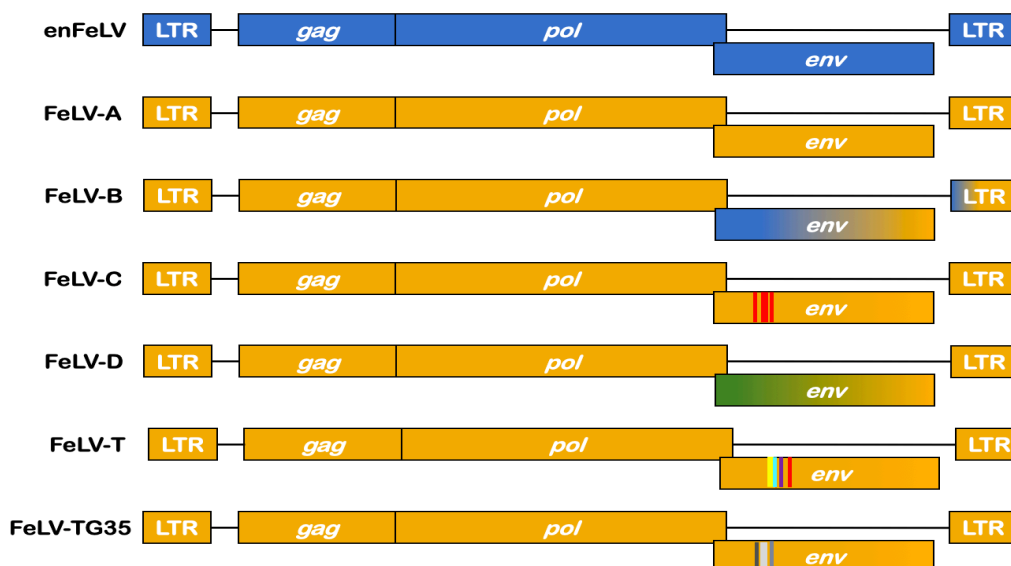


Figura 1 - Estruturas genômicas dos FeLV descritas até o momento. O enFeLV é o mais distante geneticamente do FeLV-A, com diferenças em todos os genes. FeLV-B é formado pela recombinação do gene *env*-LTR do enFeLV com o FeLV-A. FeLV-C, T e TG35 possuem inserções, substituições e deleções do genoma original (FeLV-A). Fonte: modificado de Chiu *et al.* (2018).

3.2 EPIDEMIOLOGIA DA LEUCEMIA VIRAL FELINA

O *Feline leukemia virus* foi descrito em 1964 por William Jarrett como sendo o agente infeccioso responsável por quase a metade dos casos observados de leucemia e de linfomas em gatos (Jarrett, W. F. *et al.*, 1964). Acreditava-se que aproximadamente um terço de todas as mortes relacionadas a tumores em gatos eram causadas por FeLV, porém, um número ainda maior de gatos morreu de anemia relacionada a esse agente e às infecções secundárias causadas por efeitos supressores do vírus na medula óssea e no sistema imunológico (Hartmann, 2012a). A descoberta do FeLV forneceu bases significativas para o estudo e compreensão da oncogênese ligada às infecções virais, mas, após a descoberta do FIV e do *Simian immunodeficiency virus* (SIV), os dois principais modelos animais para o estudo do *Human immunodeficiency virus* (HIV), o volume de estudos sobre o FeLV reduziu drasticamente (Chiu *et al.*, 2018). Além disso, a maioria dos estudos datam de anos anteriores ao desenvolvimento das técnicas moleculares contemporâneas (Hofmann-Lehmann *et al.*, 2008).

Apesar de ser descrito principalmente em gatos domésticos, outras espécies de felídeos já foram também relatadas como positivas para o FeLV, dentre elas, pequenos gatos selvagens, incluindo *F. silvestris* e lincas europeus e ibéricos (*Lynx pardinus*) (Luaces *et al.*, 2008; Meli *et al.*, 2009; Ostrowski *et al.*, 2003). O FeLV também foi detectado em pumas da Flórida (*Puma concolor coryi*) (Brown *et al.*, 2008; Cunningham *et al.*, 2008) causando graves problemas à saúde desses indivíduos. Um linfoma multicêntrico de células T associado à infecção por FeLV foi encontrado em uma chita namibiana em cativeiro (*Acinonyx jubatus*) (Marker *et al.*, 2003). Embora em um estudo desenvolvido na Ilha de Barro Colorado, no Panamá, (Franklin *et al.*, 2008), o FeLV não tenha sido encontrado em nenhuma das 12 jaguatiricas (*Leopardus pardalis*) avaliadas, o DNA proviral de FeLV foi detectado em um jaguatirica macho e em um gato malhado (*Leopardus tigrinus*) em um centro de vida selvagem no sul do Brasil (Guimaraes *et al.*, 2009). O FeLV também foi detectado em um lince de 11 meses de idade (*Felis rufus*), apresentando sinais de letargia, anorexia, neutropenia, linfopenia e anemia não regenerativa (Sleeman *et al.*, 2001).

Estudos epidemiológicos conduzidos em diversas partes do globo mostram que a infecção pelo FeLV em gatos domésticos é amplamente distribuída, mas com grande variação na prevalência entre as regiões. Em 2017, Burling *et al.* chegaram a uma soroprevalência, por testes imunocromatográficos, de 3,1% para FeLV e de 3,6% para FIV nos Estados Unidos e no Canadá, em um total de 62.301 gatos testados. O que mostra um aumento em relação a um estudo anterior, onde apenas 2,3% dos animais, dessa mesma região, eram positivos para FeLV (Levy *et al.*, 2006). Em 2009, em um estudo que avaliou também a antigenemia, Gleich *et al.* (2009) encontraram uma soroprevalência de 3,6% para o FeLV de um total de 17.462 gatos domiciliados. No Reino Unido, os últimos estudos que avaliam a prevalência do agente da leucemia viral felina datam em mais de 17 anos. Em 1989, Hosie *et al.* encontraram que o FeLV estava circulante em 5% dos animais clinicamente saudáveis e em 18% dos animais doentes. Em 2002, Muirden realizou um levantamento quanto à positividade para o FeLV nos felinos que eram encaminhados para a *Royal Society for the Prevention of Cruelty to Animals* (RSPCA) chegando a um total de 3,5%. Na China, o primeiro levantamento sobre a soroprevalência do FeLV foi realizado em 2016, sendo encontrado um total de 11,33% de positividade (Cong *et al.*, 2016). Na avaliação da sorofrequência do FeLV no Japão, 2,9% dos gatos apresentaram antigenemia (Maruyama *et al.*, 2003) e, em 2017, em uma avaliação regional, uma prevalência de 6,4% (Makundi *et al.*, 2017). Em 2000, a prevalência em gatos saudáveis e em doentes positivos para o FeLV em Madrid, Espanha, foi de 15,6% e de 30,4%, respectivamente (Arjona *et al.*, 2000). Como se observa, as prevalências/ocorrências são maiores em animais doentes, o que pode estar relacionado a um viés de amostragem, ou mesmo, à preocupação de só se realizar o diagnóstico dessa infecção quando o animal apresenta alguma queixa. Além disso, poucos estudos de prevalência da infecção viral foram conduzidos na última década, corroborando com o que foi dito por Chiu *et al.* (2018), quanto ao volume de estudos relacionados ao FeLV. Cabe ressaltar que muitos animais avirêmicos e portadores do DNA proviral do FeLV podem ter sido erroneamente considerados negativos pela metodologia aplicada em todos os estudos citados, carecendo de uma avaliação molecular para que se tenha uma estimativa mais realista quanto ao número de animais positivos nesses locais.

Em Belo Horizonte, estudo desenvolvido por Teixeira *et al.* (2007) revelou uma ocorrência de 32,5% de animais antígenicamente positivos para o FeLV. No entanto, Coelho *et al.* (2011) por meio de técnicas moleculares que identificam animais também na fase regressiva, encontraram uma ocorrência de 47,5%. É importante considerar que ambos os estudos realizados na população de gatos de Belo Horizonte foram conduzidos utilizando-se amostras oriundas de clínicas do município, o que pode justificar a alta proporção de animais positivos encontrados já que sua maioria era de gatos doentes. Em 2009, em um estudo de ocorrência do FeLV na cidade do Rio de Janeiro, Almeida, (2009) encontraram sorologia positiva em 11,49% dos 1094 gatos avaliados. Em Araçatuba, São Paulo, a sorofrequência de animais positivos para FeLV foi apenas de 0,33% (Sobrinho *et al.*, 2011). Em Pelotas e em Rio Grande, municípios da região sul do Brasil, Meinerz *et al.* (2010) encontraram uma positividade de 38,3% pelo método de imunofluorescência indireta.

A transmissão do vírus ocorre principalmente mediante o contato de animais susceptíveis com secreções de animais virêmicos. O número de partículas infecciosas na saliva de gatos virêmicos chega a ser 10^6 vezes maior do que a carga presente no plasma (Francis *et al.*, 1977; Gomes-Keller *et al.*, 2006). Dessa forma, o

ato de lambedura entre indivíduos, mordidas e compartilhamento de vasilhas de alimento e água, constituem as principais formas de transmissão do vírus, especialmente em ambientes com dois ou mais gatos (Dunham e Graham, 2008). Entretanto, outras rotas de transmissão como a transfusão sanguínea, o aleitamento (Pacitti *et al.*, 1986), a urina (Cattori *et al.*, 2009), e possivelmente por pulgas, também podem ocorrer (Vobis *et al.*, 2003). Em 2009, Gomes-Keller *et al.* avaliaram o potencial das fezes de animais positivos na transmissão do FeLV. Apesar de não ter sido encontrado a p27 circulante nem o DNA proviral nos animais expostos às fezes de animais virêmicos, houve desenvolvimento de resposta imune ao agente. Além disso, os autores isolaram com sucesso partículas virais infecciosas das fezes de animais virêmicos. Sendo assim, apesar de menor significância, as fezes podem ser consideradas como um potencial transmissor do FeLV (Gomes-Keller *et al.*, 2009). Agulhas contaminadas, instrumentos e fômites constituem meios para a transmissão iatrogênica do FeLV. No entanto, devido ao fato do envelope viral ser lipossolúvel e suscetível a desinfetantes, detergentes, aquecimento e ressecamento, o vírus é inativado no ambiente em minutos. (Hartmann, 2012). A transmissão vertical, da mãe para os filhotes, ocorre comumente em gatas virêmicas. Entretanto, com a imunossupressão causada pela prenhez, é possível que fêmeas com infecção regressiva reativem a replicação viral levando a infecção dos filhotes .

3.3 PATOGENIA

Após a exposição oronasal ao FeLV, o vírus se replica nas amídalas e nos linfonodos locais, disseminando-se para monócitos e linfócitos do sangue periférico. O vírus é então distribuído para o restante do tecido linfóide do organismo. Após o desenvolvimento dessa viremia transitória, o FeLV é capaz de se espalhar rapidamente para os tecidos-alvo como células linfóides, mielóides e epiteliais de divisão rápida. Neste momento, alguns animais apresentam sinais clínicos sistêmicos, característicos de processos infecciosos, tais como febre, letargia e linfadenomegalia (Sykes and Hartmann, 2013; Helfer-Hungerbuehler *et al.*, 2015) . Se a resposta imune em desenvolvimento for capaz de conter o vírus, a infecção pode ser controlada. Aproximadamente dois terços dos gatos expostos ao FeLV se recuperam, reduzindo a carga plasmática de RNA viral e proviral para níveis de moderados a indetectáveis (Hofmann-lehmann *et al.*, 2001; Hofmann-Lehmann *et al.* 2007, 2008; Sykes and Hartmann, 2013). No um terço restante, a carga viral excede a capacidade da resposta imune para eliminar a infecção e os animais desenvolvem uma viremia persistente (Hardy, *et al.*, 1976; Francis *et al.*, 1977; Hardy and Léveillé, 2003). Neles, a carga viral e proviral permanecem elevadas, os animais sucumbem às doenças associadas ao FeLV e o óbito pode ocorrer em torno de três anos após a infecção (Dunham e Graham, 2008). A capacidade do indivíduo exposto de controlar a infecção está ligada a diversos fatores, tais como a idade do gato e o *status* imune no momento da exposição, a dose de vírus a qual foi exposto, o tempo e a via de exposição e a ocorrência de doenças concomitantes. A patogenicidade do vírus também é um fator importante a ser considerado (Hartmann, 2012).

3.3.1 Estadiamento da Infecção pelo *Feline Leukemia Virus*

Em contraste com o FIV e o HIV, os resultados da infecção pelo FeLV variam de acordo com o curso da infecção, que está relacionado diretamente ao equilíbrio hospedeiro x vírus. Com o advento de técnicas moleculares capazes de identificar a presença do material genômico viral, a classificação que antes era de infecção regressiva, latente ou progressiva, foi refeita e melhor fundamentada (Torres, *et al.*, 2005; Nesina *et al.*, 2015). Dessa forma, animais que antes apresentavam viremia e, em avaliações posteriores, se negativavam, eram considerados animais que debelaram a infecção e, por consequente, imunes a uma nova infecção. Aqueles que apresentavam viremia transiente, ora positivos, ora negativos, eram considerados animais com infecção latente, e aqueles com viremia constante, animais com infecção progressiva (Lutz *et al.*, 1980; Hoover e Mullins, 1991). No entanto, hoje se sabe que os animais que contornaram a antigenemia, ou seja, que não mais apresentam p27 circulante, possuem o DNA proviral integrado em suas células. Eles são considerados carreadores da infecção e podem, em um momento oportuno, atuarem como fonte de infecção (Torres *et al.*, 2005; Hofmann-Lehmann *et al.*, 2008). A proteína p27, codificada pelo gene *gag* do FeLV, é produzida em grande quantidade nas células infectadas, excedendo o necessário para a

montagem de novas partículas virais (Hartmann *et al.*, 2001). Sykes and Hartmann, 2013). Trata-se do marcador de infecção mais utilizado pelos testes imunocromatográficos e ELISA diretos .

3.3.1.1 Infecção Abortiva

Após a exposição inicial, gatos imunocompetentes podem suprimir a replicação viral e nunca se tornarem virêmicos (Rojko *et al.*, 1979; Hoover e Mullins, 1991). Esses são os animais anteriormente chamados de “regressores”. São indivíduos que possuem altos títulos de anticorpos neutralizantes contra o FeLV mas nem o material genômico viral (RNA e DNA) nem a proteína p27 são detectados pelos métodos disponíveis (Torres *et al.*, 2005; Hofmann-Lehmann *et al.*, 2007; Major *et al.*, 2010; Helfer-Hungerbuehler *et al.*, 2015). O estágio abortivo pode estar ligado à exposição à baixas quantidades de vírus (Dunham e Graham, 2008; Sykes e Hartmann, 2013). Apesar de não haver viremia, animais com infecção abortiva desenvolvem resposta imune contra o vírus (Major *et al.*, 2010). Gatos classificados como tendo experimentado uma infecção abortiva podem não ser distinguidos daqueles nunca expostos ao FeLV com base em na detecção da proteína p27 por técnicas de ELISA, e/ou PCR de sangue e tecidos (Torres et al. 2005). Semelhante à vacinação, esses a resposta imune desenvolvida não confere imunidade à novas exposições pelo FeLV, devendo o animal permanecer sob vacinação contra o agente.

3.3.1.2 Infecção Progressiva

Quando a infecção não é contida pelo sistema imune do animal, a replicação viral ocorre de forma extensiva. O animal se torna persistentemente virêmico e com alto potencial de transmissão do vírus para outros gatos (Hartmann, 2012a). Felinos com infecção progressiva possuem baixos títulos de anticorpos neutralizantes. A replicação viral ocorre de forma contínua nos órgãos linfoides e nas glândulas salivares. Gatos com infecção progressiva apresentam elevadas cargas viral e proviral por longos períodos de tempo (Powers *et al.*, 2018; Willett e Hosie, 2013). Esse curso da infecção leva ao desenvolvimento de doenças associadas ao FeLV, e com isso, o tempo de sobrevivência médio do animal quando os sinais clínicos começam a aparecer é cerca de três anos. Aproximadamente um terço de todos os gatos infectados se torna persistentemente virêmico (Hardy, *et al.*, 1976; Helfer-Hungerbuehler, *et al.*, 2015). Gatos jovens ou imunossuprimidos são os animais que apresentam os maiores riscos de desenvolverem a infecção progressiva fatal (Hartmann, 2012b). Durante a fase aguda da infecção, não há diferenças quanto às cargas proviral e viral séricas do FeLV (Hofmann-Lehmann *et al.*, 2001; Hofmann-Lehmann *et al.*, 2007). A distinção pode ser realizada com a repetição de testes para o antígeno viral intervaladas por oito ou mais semanas. Os animais com infecção progressiva devem ser tratados com imuno-moduladores na tentativa de ajudar o sistema imune a suprimir a infecção ou reduzir as cargas viral e pró viral. Não existem tratamentos curativos.

3.3.1.3 Infecção Regressiva

Alguns animais conseguem suprimir a replicação viral após algumas semanas de infecção, antes de haver acometimento da medula óssea (Hartmann, 2012b; Sykes e Hartmann, 2013). Apesar da integração viral ao genoma das células do gato ocorrer, e o com isso, o DNA proviral permanecer integrado ao genoma felino indefinidamente, não há produção e excreção de partículas víricas infecciosas. Em muitos indivíduos, essa regressão ocorre após um período inicial de viremia onde a maioria dos órgãos linfoides já foram acometidos (Hartmann, 2012b; Hofmann-Lehmann *et al.*, 2006). Durante as primeiras semanas de infecção, a p27 livre no plasma pode ser detectada por testes sorológicos, e o animal pode ainda eliminar o vírus no ambiente. A antigenemia transitória é seguida pelo estabelecimento de cargas provirais baixas ou moderadas (Hofmann-Lehmann *et al.*, 2001; Hofmann-Lehmann *et al.*, 2006, 2008; Powers *et al.*, 2018). Os animais desenvolvem resposta imune eficiente com anticorpos neutralizantes e linfócitos T citotóxicos específicos para o FeLV (Flynn *et al.*, 2000; Hofmann-Lehmann *et al.*, 2001). Foi postulado que o provirus aumenta continuamente a resposta imune específica de FeLV nos gatos regressores (Hofmann-Lehmann *et al.*, 2006). Quando a viremia persiste por mais de três semanas, a medula óssea torna-se infectada, e discrasias hematopoiéticas começam a ocorrer. Granulócitos e plaquetas infectadas começam a circular pelo organismo. A partir deste ponto, o antígeno p27 se torna detectável em ensaios de

imunofluorescência.(Hartmann, 2012). Quanto mais longo for o período de viremia, menores são as chances de controle da infecção. Após três semanas, o sistema imune do animal ainda é capaz de controlar a infecção, levando a uma ausência de antigenemia e de produção de partículas víricas. No entanto, a infecção da medula óssea já se estabeleceu e o DNA proviral se tornou parte do material genômico de células troncos. Nestes casos, a infecção adquire o caráter de “latência” (Hofmann-Lehmann *et al.*, 2008; Rojko *et al.*, 1979). A partir daí, apenas técnicas moleculares, ou a cultura *in vitro* de material proveniente da medula óssea, são eficientes na detecção da infecção. Todavia, processos imunossupressores, como o efeito hormonal durante a gestação, cirurgias, medicação ou mesmo, outras situações estressantes, podem possibilitar a reativação viral e a mudança de curso para a infecção progressiva (Sykes and Hartmann, 2013; Helfer-Hungerbuehler *et al.*, 2015). Gatos regressores não desenvolvem doenças relacionadas à infecção pelo FeLV e possuem um maior tempo de sobrevivência pós infecção. No experimento conduzido por Helfer-Hungerbuehler *et al.* (2015), os animais regressores sobreviveram por períodos superiores a 12 anos. A infecção regressiva é mais comumente encontrada em gatos mais velhos. Animais que se recuperam e testam negativo para o antígeno viral no plasma, mas mantêm níveis detectáveis de RNA viral plasmático, são considerados de maior risco de reativação da infecção latente do que gatos com RNA viral plasmático indetectável após a recuperação (Torres *et al.*, 2005; Hofmann-Lehmann *et al.*, 2007) Todavia, gatos com infecção regressiva podem apresentar cargas detectáveis de provirus e de RNA mesmo muitos anos após a infecção (Hofmann-Lehmann *et al.*, 2008; Helfer-Hungerbuehler *et al.*, 2015)

Apesar dos sinais clínicos mais comuns da FeLV estarem diretamente ligados à presença de viremia, gatos regressores podem em longo prazo desenvolver processos neoplásicos em decorrência do desequilíbrio celular causado com a integração do genoma viral. Como não há um lugar padrão para a inserção do provirus, diferentes sinais regulatórios e/ou inibitórios da replicação celular podem ocorrer (Levy *et al.*, 1984; Hartmann, 2012a).

3.3.1.4 Infecção Focal ou Atípica

A infecção focal ou atípica é caracterizada pela replicação viral restrita em alguns órgãos, ou tecidos, sem o acometimento sistêmico do indivíduo. Essa infecção é apontada como rara de acontecer naturalmente, sendo observado principalmente em infecções experimentais pelo FeLV (Gomes-Keller *et al.*, 2009; Hartmann, 2012b). O diagnóstico desse padrão de infecção é desafiador pois a produção de p27 é intermitente ou muito baixa. Gatas gestantes com infecção restrita à glândula mamária pode transmitir o vírus para a prole por meio da amamentação (Pacitti *et al.* 1986; Hayes *et al.*, 1989). Resultados fracamente positivos ou discordantes (ora negativo, ora positivo) podem também ocorrer.

3.4 DIAGNÓSTICO

Muitos são os tipos de testes desenvolvidos para a detecção da infecção pelo FeLV. O diagnóstico pode ser realizado pela identificação da proteína de capsídeo (p27) circulante, pela detecção e amplificação do DNA integrado e do RNA viral circulante ou através do isolamento viral. Diferente do FIV, cuja infecção é caracterizada por pouca produção de partículas víricas, o FeLV produz a p27 em excesso (Hartmann *et al.*, 2001). Compreender como cada teste funciona e suas limitações é fundamental na interpretação dos resultados.

3.4.1 Imunocromatografia e Ensaio Imunoenzimáticos

Testes como o imunocromatográfico e os ensaios imunoenzimáticos (ELISA) laboratoriais são capazes de identificar a p27, proteína mais abundante do FeLV, presente na circulação sanguínea são amplamente utilizados para triagem (Hartmann, 2012b). A maioria dos testes para a utilização direta em clínicas e hospitais veterinários baseia-se no princípio da imunomigração rápida (imunocromatografia ou fluxo lateral). O princípio da imunocromatografia é similar ao do ELISA com modificações apenas no desenho (Hartmann, 2012b).

As técnicas imunoenzimáticas se baseiam no princípio da interação antígeno-anticorpo. Por meio da utilização de proteínas de captura (antígenos ou anticorpos) presente nos testes, a proteína alvo quando presente na espécime avaliada será retida na plataforma. Em seguida, quando adicionado o anticorpo/antígeno conjugado (com uma enzima acoplada em sua estrutura), havendo a presença da proteína que se busca encontrar, o conjugado irá se ligar a ela, e mudará a cor do meio quando for adicionado o substrato para essa enzima. Alguns testes utilizam-se de estruturas mais complexas, geralmente adicionando mais etapas com anticorpos secundários, aumentando assim a sensibilidade do teste (Gan *et al.*, 2013)

Desconsiderando-se a ocorrência de erros operacionais na realização da técnica, esses testes são altamente sensíveis na identificação de gatos virêmicos. Animais considerados positivos por essas metodologias dificilmente apresentam resultados negativos em testes confirmatórios, como a PCR (Lutz, Hans *et al.*, 2009) e a imunofluorescência (Hartmann *et al.*, 2007). No entanto, devido às características da infecção pelo FeLV, gatos regressores não são identificados como portadores do vírus já que são antígeno negativos (Willett e Hosie, 2013). A sensibilidade diagnóstica e a especificidade dos testes de imunocromatografia são comparáveis às do ELISA. Testes p27 com resultados fracos positivos ou testes positivos limítrofes podem indicar infecção latente na medula óssea (Willett e Hosie, 2013), animal em processo de regressão da infecção ou mesmo, infecções recentes que estejam ainda com baixos níveis de antígenos circulantes. Devido às características epidemiológicas de cada localidade e as implicações de um diagnóstico equivocado, é fundamental a confirmação do resultado obtido no ELISA ou na imunocromatografia (Sykes e Hartmann, 2013). Além disso, gatos com infecção recente podem não ser identificados nessas duas plataformas. (Powers *et al.*, 2018) Powers *et al.* (2018) demonstram que a antigenemia de FeLV diagnosticada pelo teste ELISA SNAP é consistente com alta viremia plasmática e alta carga proviral. Além disso, os resultados positivos obtidos foram consistentes em todos os animais que apresentavam carga viral plasmática igual ou maior que 1×10^3 cópias/mL de plasma. Como o agente possui um período de infecção em torno de 21 dias, gatos que possivelmente foram expostos a ele em um período inferior a 30 dias devem ser retestados dentro de quatro a oito semanas (Sykes e Hartmann, 2013), ou seja, é necessário que se aguarde o período da janela imunológica para se assegurar que o animal realmente não se infectou. Uma vez que a viremia pode ainda não ser detectável, exames moleculares devem ser feitos para a exclusão da infecção.

Apesar de poderem ser executados com soro, plasma ou sangue total, a utilização desta última em testes de ELISA apresenta maiores taxas de resultados falso-positivos, principalmente em amostras hemolisadas (Hartmann, 2012b). Isso ocorre porque algumas proteínas presentes nas membranas das hemácias, ou liberadas no plasma ou soro após a hemólise, podem se ligar de forma inespecífica às proteínas do teste diagnóstico. Assim, essas reações podem gerar equívocos na leitura automatizada. Em contrapartida, a membrana filtrante dos testes imunocromatográficos impede que o mesmo aconteça nessas plataformas (Hartmann *et al.*, 2001).

ELISAs com a utilização de saliva e de lágrima também foram desenvolvidos para o diagnóstico da infecção pelo FeLV. Todavia, ambos se mostraram com baixa acurácia, possivelmente por causa da eliminação intermitente de vírus (Hawkins *et al.* 1991). Entretanto, o desempenho de três testes comercialmente disponíveis na Austrália foi comparado por Westman e colaboradores (2016) utilizando-se sangue total e saliva. Não foi observada diferença estatística entre as duas amostras utilizadas. Apesar disso, como a maioria dos testes é padronizada para utilização com soro, plasma e/ou sangue total, a interpretação dos resultados, quando amostras não séricas são utilizadas, deve ser realizada com muita cautela.

A realização de ELISAs para a identificação de anticorpos contra o FeLV foi executada por Russell e Jarrett (1978), e por Lutz *et al.* (1983) com a utilização de proteínas do gene *gag* p55 e p27. No entanto, anticorpos são dificilmente identificados em infecções persistentes (Hartmann, 2012b), e animais com infecções abortiva ou regressiva podem eliminar o vírus, gerando redução no título de anticorpos contra o FeLV ao longo do tempo. Além do mais, a presença do enFeLV e a vacinação contra o agente induzem a formação de anticorpos que podem erroneamente serem identificados por testes indiretos (Hartmann *et al.*, 2001). Conhecer o histórico vacinal não agregaria valor ao diagnóstico uma vez que as vacinas contra o FeLV utilizadas atualmente não conferem imunidade esterilizante aos animais. Sendo assim, o animal pode apresentar anticorpos por estar positivo e também já ter sido vacinado contra o agente em algum ponto de sua vida (Hartmann, 2012b; Hofmann-Lehmann *et al.*, 2007, 2008).

3.4.2 Imunofluorescência (IFA – Immunofluorescent Antibody)

Ensaio de imunofluorescência direta (IFA) podem ser realizados para a detecção de antígenos estruturais do FeLV no citoplasma de leucócitos e de plaquetas infectados, em esfregaços de sangue periférico ou de medula óssea. Trata-se de uma técnica que permite a visualização de antígenos nos tecidos ou em suspensões celulares utilizando corantes fluorescentes, que absorvem luz e a emitem num determinado comprimento de onda, e visualizado em microscópios especiais. Semelhante à técnica de ELISA, nesta o corante está conjugado a um anticorpo, primário ou secundário, que através das ligação específica antígenos-anticorpo permite a fixação da estrutura no local. A IFA possui sensibilidade menor do que os ELISAs sendo também mais propensa a resultados equivocados (Sykes e Hartmann, 2013). Por esse motivo, a técnica não é indicada para triagem. Entretanto, mais de 90% dos animais com infecção progressiva são satisfatoriamente identificados por ela (Sykes e Hartmann, 2013). Gatos em viremia transiente ou em fase de regressão podem apresentar resultados negativos na IFA. Os resultados positivos indicam infecção progressiva e acometimento da medula óssea. Em gatos FeLV progressivos com leucopenia, a IFA pode apresentar resultado falso-negativo se a amostra utilizada for de sangue periférico (Lutz *et al.*, 2009; Sykes e Hartmann, 2013).

3.4.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Diferentemente da IFA e do ELISA, a reação em cadeia da polimerase (PCR) não detecta antígenos virais circulantes, mas sim sequências de ácidos nucleicos do vírus no sangue, na medula óssea ou em tecidos. Trata-se de um método bastante sensível que aumenta a capacidade de detecção ao amplificar de forma exponencial sequências específicas do genoma (Hoover *et al.*, 1987). A PCR é considerada o melhor teste para o diagnóstico de infecções regressivas e para a resolução de discordâncias entre testes convencionais (Hartmann, 2012b). Ela é capaz de detectar a presença do vírus de forma rápida, com apenas uma ou duas semanas de exposição (Little, 2011a). O advento da PCR promoveu a ampliação do conhecimento sobre a patogenia do FeLV (Torres, *et al.*, 2005; Hofmann-Lehmann *et al.*, 2008; Hartmann, 2012a; Chiu *et al.* 2018).

A PCR em tempo real permite a quantificação da carga viral e proviral. (Torres, *et al.*, 2005; Cattori *et al.*, 2006, 2008, 2009; Gomes-Keller, *et al.*, 2006; Torres *et al.*, 2008). A carga viral em animais regressores foi identificada como sendo 300 vezes menor do que a encontrada em animais com infecção progressiva (Hofmann-Lehmann, R. *et al.*, 2001). Outros autores mostraram que de 5 a 10% dos gatos com antigenemia indetectável são portadores do provirus do FeLV (Gomes-Keller, *et al.*, 2006). Esses resultados contradizem a afirmação de que 60% dos gatos expostos ao FeLV se recuperam, não apresentando viremia (Hofmann-Lehmann *et al.* 2001, 2007, 2008; Sykes e Hartmann, 2013). A quantificação da carga proviral pode ser utilizada como fator prognóstico nas infecções. Cargas elevadas podem significar um maior acometimento de células, podendo explicar muitos achados clínicos.

A detecção de vírus na saliva também é possível por PCR. Ao avaliar a excreção viral via saliva, Gomes-Keller *et al.* (2006) verificaram que animais regressores, com baixa carga proviral, não eliminam ácidos nucleicos do FeLV na saliva, mas em contrapartida, esta é uma característica comum aos animais progressivos. Em animais naturalmente infectados, os autores encontraram sensibilidade e especificidade para a identificação de ácidos nucleicos na saliva muito superiores às de testes para a detecção de antígeno no sangue (Gomes-Keller *et al.* 2006a, 2006b).

Embora a PCR se apresente como uma técnica eficiente para o diagnóstico da Leucemia Viral Felina, erros técnicos, como a degradação do material nucleico por acondicionamento inadequado de amostras ou mesmo uma possível contaminação podem levar a resultados equivocados de diagnóstico (Hartmann, 2012b). Além do mais, a amplificação de fragmentos inicia-se a partir de sequências pré-estabelecidas pelo laboratório, identificadas pelos *primers* ou sondas. Isso faz com que a PCR se torne dependente do conhecimento do tipo da estirpe viral presente ou circulante em uma determinada região geográfica. Por frequentemente sofrerem mutações, pequenas variações nas sequências de aminoácidos do FeLV podem

levar a uma imparidade do *primer*/sonda com o ácido nucleico presente e não ocorrer a amplificação do vírus infectante. Dessa maneira, resultados negativos não necessariamente significam inexistência de infecção, principalmente quando o animal já apresenta sinais característicos da infecção pelo FeLV.

2.4.4 Isolamento Viral

Por detectar partículas víricas infectantes, o isolamento do FeLV em cultivo de células a partir do plasma de animais positivos é considerado o “padrão ouro” ou o critério final para diagnóstico (Lutz *et al.*, 2009). Porém, a complexa logística torna a técnica impraticável na rotina laboratorial. Falhas no transporte e na estocagem das amostras podem inativar o vírus e implicar em resultados falso-negativos (Hartmann *et al.*, 2001, 2007). Além disso, o isolamento viral necessita de tempo para crescimento e técnicas especializadas, reduzindo ainda mais sua aplicabilidade na prática clínica (Sykes e Hartmann, 2013). Ter antigenemia não significa presença do vírus infeccioso. Em animais com infecção focal, em que a replicação viral fica restrita a determinados sítios, a antigenemia pode ser intermitente ou baixa, e o vírus ser liberado no sangue ocasionalmente (Hartmann *et al.*, 2001). A confirmação do crescimento viral é feita por PCR ou por meio de testes para a detecção de antígenos no sobrenadante dos cultivos (Sykes e Hartmann, 2013)

O isolamento viral pode ser feito também a partir de diferentes amostras biológicas (Pacitti *et al.*, 1986; Lutz *et al.*, 1987; Gomes-Keller *et al.*, 2006, 2009; Cattori *et al.*, 2009). Gomes-Keller *et al.* (2006) realizaram o isolamento viral na saliva de 83,5% dos animais progressivamente infectados, confirmando o papel crucial da saliva na epidemiologia da doença. Ao avaliar a importância das fezes na transmissão do FeLV, Gomes-Keller *et al.* 2009 isolaram com sucesso o vírus infectante de fezes de animais progressivamente infectados. Cattori *et al.* (2009) ao avaliarem a cinética de eliminação viral em animais virêmicos, observaram que a partir da quarta semana de infecção, partículas infecciosas podem ser isoladas de saliva e fezes, e a partir da nona semana, também da urina.

2.4.5 Interferência Viral

O FeLV é classificado em subtipos de acordo com suas diferenças genéticas e em suas patogenias. Para a identificação de qual subtipo viral está infectando o animal, ensaios de interferência viral podem ser realizados como uma alternativa às técnicas moleculares. Foi por meio deste método que os primeiros estudos relacionados aos subtipos foram realizados (Anai *et al.*, 2012; Ito *et al.*, 2013; Sarma e Log, 1973). A técnica basicamente avalia a capacidade de uma estirpe viral em limitar a infecção de um segundo isolado viral. Esta interferência ocorre através de mecanismos intrínsecos, como a presença de interferons e da exaustão de receptores intracelulares, e extrínsecos, resultantes de vias celulares que são perturbadas durante a infecção. O extrínseco é causado pelo bloqueio competitivo do receptor do vírus por proteínas ou outros vírus que se ligam ou obstruem a entrada mediada pelo receptor para vírus subsequentes.

Em cultivo de células de fibroblastos embrionário felino, verificou-se que quando estes eram infectados primeiramente com o FeLV-A, e em seguida desafiados à infecção pelos subtipos B e C, havia a ocorrência de co-infecções. As infecções por subtipos diferentes ocorriam com sucesso, mas houve inibição da infecção quando o cultivo já infectado pelo FeLV-A foi novamente exposto ao mesmo subtipo. Isto é, uma célula infectada pelo FeLV-A é ainda susceptível às infecções por um segundo subtipo, mas é resistente à uma reinfecção pelo mesmo. Em contrapartida, ao se avaliar o comportamento da infecção quando a infecção primária era causada pelo subtipo B ou C, e o desafio realizado com o FeLV-A, a infecção por este não ocorria. Isso levou a evidência de que o FeLV-A é um precursor necessário ao desenvolvimento de superinfecções, de maior patogenicidade, pelo vírus da leucemia felina (Chiu *et al.*, 2018).

4. MATERIAL E MÉTODOS

As amostras obtidas são oriundas do banco de amostras - *swab* e sangue total - do projeto aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG) sob protocolo de número 384/2017 (Anexo 8.1).

4.1 ANIMAIS

As amostras foram coletadas de animais domiciliados e de abrigos do município de Belo Horizonte. Sexo, raça e a origem dos animais não foram considerados critérios de escolha para o grupo amostrado. O animal mais novo testado foi com 45 dias de vida e o mais velho 12 anos de idade. A condição clínica do animal não se constituiu um fator excludente.

4.2 COLETA DE AMOSTRAS

4.2.1 Amostras de Sangue e Triagem

A coleta de sangue foi realizada por venopunção da veia cefálica, em volumes iguais em tubos à vácuo contendo como anticoagulante o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e em tubos para a separação de soro. Nenhum gato foi submetido à sedação para a coleta, apenas contenção manual. Em cada coleta, além do sangue, foram coletados também *swab* conjuntival, oral e retal. O sangue coletado foi imediatamente centrifugado após a coleta a 2300 xg por 10 minutos. Separou-se o soro, o plasma e a capa leucocitária, desprezando-se o excedente constituído por hemácias. Todas as amostras foram armazenadas a -20°C até o momento da utilização. Antes do congelamento, utilizou-se parte do plasma para a realização do imunoensaio para a identificação simultânea da antigenemia do FeLV (p27) e anticorpos anti-FIV, como teste de triagem, conforme orientações do fabricante do teste rápido *SNAP Combo FeLV Ag/FIV Antibody Test* (IDEXX, Inc). Resumidamente, após o equilíbrio de temperatura do kit e da amostra à temperatura ambiente por 30 min., adicionou-se três gotas de plasma em um microtubo de 2mL. Adicionou-se em seguida, quatro gotas do conjugado (H316/P332+P313/EUH208) no tubo contendo a amostra, seguido por inversões do mesmo (de três a cinco vezes). O produto obtido após a mistura foi adicionado ao poço da amostra e o resultado lido após dez minutos. A leitura dos resultados foi realizada por avaliação visual direta (a olho nu). Apesar da marcação ser bastante evidente para a maioria das amostras, todos os resultados foram submetidos ao crivo de três médicos veterinários, e o resultado final, quando em discordância, dado pelo resultado mais comum dentre as avaliações. Os valores publicados pelo fabricante referentes à sensibilidade e à especificidade foram 98,6% e 98,2%, respectivamente para o FeLV, e 93,5% e 100% para o FIV. Adotou-se a PCR de capa leucocitária, descrita a seguir, como teste confirmatório. O fluxograma de todo o procedimento experimental pode ser visualizado na figura 2.

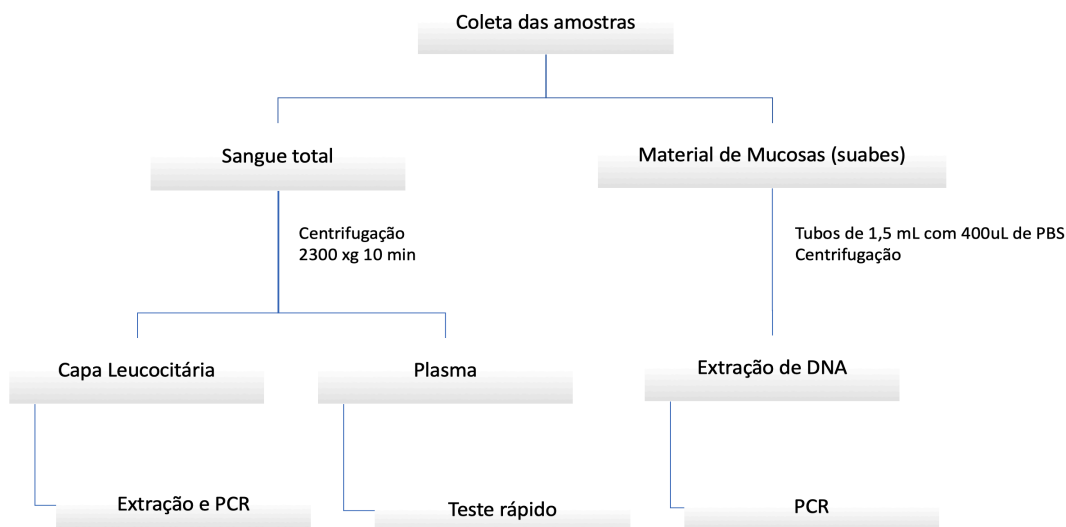


Figura 2 - Fluxograma com as etapas de processamento e ensaios laboratoriais das amostras. Após a coleta de sangue, foram realizadas as coletas dos suabes conjuntival, oral e retal. Imediatamente após a coleta, o sangue foi centrifugado para a segregação do plasma e das hemácias. Três gotas do plasma foram utilizadas para a execução do teste rápido, conforme orientação do fabricante. A capa leucocitária presente sobre a camada de hemácias foi coletada para posterior extração do DNA e PCR. Os suabes coletados, foram colocados em microtubos de 1,5mL contendo 400uL de PBS. Foram submetidos a centrifugação e a haste descartada. 200uL do material presente em cada tubo foram utilizados para a extração de DNA e PCR conforme descritos nos itens 3.2; 3.3 e 3.4.

4.2.2 Swab Conjuntival (SC), Oral (SO) e Retal (SR)

A coleta de material celular oriundo das mucosas conjuntival, oral e retal deu-se por meio do atrito da haste algodoadada contra as mesmas. Utilizou-se dois *swab* para a coleta de material conjuntival, sendo um para cada olho; dois para a coleta de material celular oral, um para cada lado da boca; e um para a mucosa retal. A mucosa conjuntival inferior foi percorrida pela haste de algodão no sentido lateral-medial com simultâneo movimento rotacional da haste. O mesmo procedimento foi realizado para a mucosa da pálpebra superior. Em seguida, colocou-se os *swab* em microtubos de 1,5mL contendo 400µL de solução salina tamponada de fosfato (PBS – *Phosphate-buffered saline*) e congelou-se a -20°C até a extração do material genômico.

A mucosa oral foi atritada por dez segundos por *swab*, em cada lado. Percorreu-se as gengivas superiores e inferiores e a mucosa interna do músculo bucinador (bochechas). A estocagem dos *swab* foi idêntica ao realizado para os *swab* conjuntival.

Para a obtenção de material celular da mucosa retal, inseriu-se o *swab* no reto do animal, posteriormente ao esfíncter, percorrendo a mucosa em um movimento circular de 360°. Durante esse movimento, rotacionou-se a haste para aumentar o volume de material coletado. A estocagem dos *swab* foi idêntica ao realizado para os *swab* conjuntival.

4.3 EXTRAÇÃO DE DNA

4.3.1 Amostras de Sangue

Extraiu-se o material genômico total presente na capa leucocitária por meio do kit comercial *ReliaPrep Blood and gDNA Miniprep System* (PROMEGA, USA), conforme o protocolo do fabricante. Nas amostras cujo volume de material era inferior ao mínimo necessário para a realização da extração, acrescentou-se 200µL de PBS e realizou-se a homogeneização. Do produto final, foram utilizados 190µL como material

para extração do DNA. Todas as amostras submetidas à diluição apresentaram resultados satisfatórios para a extração, porém pela possibilidade de obtenção de uma concentração menor de ácidos nucleicos, eluiu-se o DNA com apenas 80µL de *Nuclease-Free Water*, e não 100-200µL, como preconizado.

4.3.2 Amostras de *Swab*

A extração de DNA de amostras coletadas por meio de *swab* seguiu o protocolo utilizado por Gomes-Keller *et al.*, (2006). De forma sucinta, os tubos foram descongelados à temperatura ambiente, e após o descongelamento, incubados a 42°C durante dez minutos. Após este procedimento, os tubos contendo os *swab* imersos em PBS foram centrifugados a 8000 xg por 1 minuto. Em seguida, inverteu-se as hastes utilizando-se de pinças previamente imersas em etanol absoluto 100% (dentre cada amostra) no intuito de se reduzir a ocorrência de contaminação cruzada. Os tubos foram novamente centrifugados à 800 xg por um minuto, as hastes foram descartadas e o produto final foi utilizado para extração dos ácidos nucleicos. A extração foi realizada com o kit comercial *ReliaPrep Blood and gDNA Miniprep System* (PROMEGA, USA). Extraíu-se as amostras de *swab* retal em momentos diferentes das demais extrações, visando-se reduzir a contaminação por matéria fecal sobre as demais amostras.

4.4 Detecção do DNA proviral do FeLV por PCR

4.4.1 GAPDH como verificador da qualidade da Extração de DNA

Submeteu-se os produtos da extração de DNA à amplificação do fragmento do gene *GAPDH* (*glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*), conforme padronizado por De Oliveira (2012). Após a corrida eletroforética, a presença ou ausência de banda na altura de 709pb, referente ao fragmento amplificado, serviu para verificar a eficiência do processo de extração. A PCR foi realizada para um volume final de 25µL por amostra, com os seguintes reagentes: 5µL de 5xGreen GoTaq Flexi Buffer (PROMEGA, USA), 1,5 µL de MgCl⁺², 1,0 µL de cada primer (10pmol/µL, Invitrogen, USA), 0,5 µL de dNTPs (10 mM, PROMEGA, USA), 0,2µL de GoTaq Polimerase (500U, PROMEGA, USA) e 13,8µL de água ultrapura livre de RNase e DNase. Adicionou-se ao produto final, 2,0µL de DNA. Os *primers* utilizados foram: 5'-GGTGATGCTGGTGCTGAGTA-3' (*forward*) 3'-CCCTGTTGCTGTAGCCAAAT-5' (*reverse*). A desnaturação inicial ocorreu a 95°C, durante três minutos, seguida por 35 ciclos com 30 segundos de duração a 95°C; 30 segundos a 54°C, e por 40 segundos a 72°C em cada ciclo. Sendo o primeiro binômio tempo-temperatura equivalente à desnaturação, o segundo ao anelamento, e o terceiro, à extensão. O processo final, de amplificação, durou sete minutos sob temperatura de 72°C. Após a amplificação, os produtos obtidos foram visualizados em gel de agarose a 1,5%, após eletroforese, marcado com brometo de etídio e visualizado em transiluminador de luz ultravioleta.

4.4.2 Identificação Molecular do DNA Proviral do FeLV

Devido à divergência existente na literatura sobre qual teste deve ser utilizado como padrão ouro para o diagnóstico da FeLV (Hartmann *et al.*, 2001) utilizou-se como referência a identificação do DNA proviral presente em células mononucleares de sangue periférico em amplificação por PCR convencional. Foram utilizados *primers* desenhados com base na sequência de genes *gag*, disponíveis no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI – GenBank: KP728112.1), e correspondem à amplificação de um fragmento de 450 pares de base comum a todos os subtipos do FeLV exógeno (Finoketti, 2011). Utilizou-se os mesmos *primers* e as mesmas condições de amplificação para a identificação do fragmento no material genômico de todas as amostras extraídas. As amostras de um mesmo indivíduo que apresentaram divergência de resultados, foram submetidas a uma *nested* PCR (*nPCR*), seguindo protocolo de estabelecido por Bande *et al.* (2014).

A PCR para o fragmento de 450pb foi realizada para um volume final de 25µL por amostra, com os seguintes reagentes: 5 µL de 5xGreen GoTaq Flexi Buffer (Promega, USA), 1,0 µL de MgCl⁺², 1,0 µL de cada primer (10pmol/µL, Invitrogen, USA), 0,5 µL de dNTPs (10 mM, PROMEGA, USA), 0,2µL de GoTaq Polimerase (500U, PROMEGA, USA) e 14,3µL de água ultrapura livre de RNase e DNase. Adicionou-se ao produto final, 2,0µL de DNA da amostra. Os *primers* utilizados foram: 5'-ACTAACCAATCCCCACGC-3' (*forward*) e 3'-ATGGCTGTCCCACTAGAG-5' (*reverse*). A

inicialização ocorreu a 94°C, durante cinco minutos, seguida por 35 ciclos com um minuto de duração a 94°C (desnaturação); um minuto a 54°C (anelamento), e por um minuto a 72°C (extensão) por ciclo. O processo final, de amplificação, durou cinco minutos sob temperatura de 72°C (figura 3). Os produtos obtidos foram visualizados em gel de agarose 1,5%, em corrida eletroforética, marcado com brometo de etídio, em altura equivalente à banda esperada.

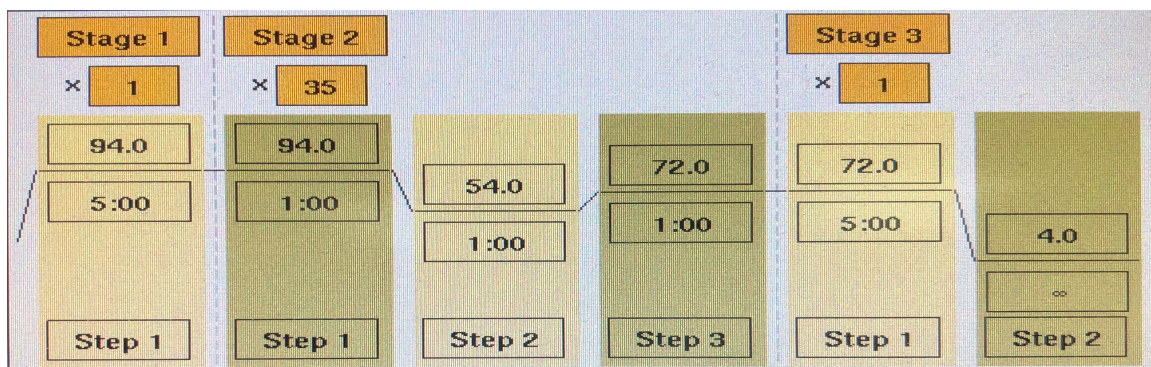


Figura 3- Curva de tempos e temperatura para amplificação do fragmento de 450pb do gene *gag* do FeLV, conforme padronizado por Finoketti et al. (2011). *Stage 1*: Tempo e temperatura de Inicialização (ativação da enzima). *Stage 2*: 35 ciclos das seguintes etapas A: binômio tempo x temperatura para desnaturação; B: binômio tempo x temperatura para anelamento; A: binômio tempo x temperatura para extensão/alongamento. *Stage 3*: binômio tempo x temperatura para alongamento final.

A *n*PCR utilizada para amostras com resultados seguiu o estabelecido por Bande et al. (2014). Os volumes dos reagentes para as reações de amplificação do gene externo e do gene interno foram iguais, variando apenas os *primers* adicionados. Foram utilizados os seguintes reagentes: 5.1 µL de 5xGreen GoTaq Flexi Buffer (Promega, USA), 1,5 µL de MgCl², 1,5 µL de cada primer (10pmol/µL, Invitrogen, USA), 0,5 µL de dNTPs (10 mM, PROMEGA, USA), 0,25µL de GoTaq Polimerase (500U, PROMEGA, USA) e 9,65µL de água ultrapura livre de RNase e DNase. Adicionou-se ao produto final da primeira reação 2,0µL de DNA da amostra. Para a segunda reação, foram adicionados 2µL do produto amplificado da primeira reação. Os dois conjuntos de *primers* usados para amplificar o segmento de 601pb equivalentes a parte da região *gag* e o segmento FeLV-U3LTR. Os *primers* externos utilizados foram: U3-Forward: 5'-ACAGCAGAAGTTTCAAGGCC-3' e reverse 5'-GACCAGTGATCAAGGGTGAG-3'. Como *primers* internos: U3-Forward (5'-GCTCCCCAGTTGACCAGAGT-3') e reverse (5'-GCTTCGGTACCAAACCGAAA-3'. A desnaturação inicial ocorreu a 94°C, durante dois minutos, seguida por 35 ciclos com 45 segundos de duração a 94°C (desnaturação); 30 segundos a 60°C (anelamento), e por um minuto a 72°C (extensão) por ciclo. O processo final, que consiste na amplificação, teve duração de dez minutos sob temperatura de 72°C. Os produtos obtidos na segunda reação foram visualizados em gel de agarose 1,5%, em corrida eletroforética, marcado com brometo de etídio, em altura equivalente à banda esperada.

4.5 SEQUENCIAMENTO

O sequenciamento de nucleotídeos dos amplificados foi realizado pelo laboratório Myleus Biotecnologia (Belo Horizonte, Minas Gerais), utilizando o método Sanger (Sanger *et al.*, 1977) Amostras de cada categoria, consideradas positivas na PCR, tiveram suas bandas extraídas do gel de agarose utilizando-se o kit *GenElute™ Gel Extraction Kit* (Sigma-Aldrich) conforme protocolo estabelecido pelo fabricante. Comparou-se a similaridade das sequências obtidas com as disponíveis no banco de genomas NCBI (BLAST® - <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

4.6.1 Ocorrência de FeLV na População Avaliada

Para se conhecer a ocorrência do FeLV na população avaliada, determinou-se a taxa de positividade e negatividade em todas as metodologia utilizada.

4.6.2 Sensibilidade e Especificidade

A sensibilidade e a especificidade de cada PCR de *swab* foi obtida em relação ao resultado da PCR de capa leucocitária. Para tal, utilizou-se as seguintes fórmulas

$$\text{Sensibilidade (s):} \quad s = \frac{VP}{VP+FN}$$

$$\text{Especificidade (e):} \quad e = \frac{VN}{VN+FP}$$

(Medronho e Perez, 2008)

Onde, VP: número verdadeiramente positivos; VN: número verdadeiramente negativo; FP: número de falso positivo; FN: número de falso negativo.

Pelo fato do teste imunocromatográfico identificar apenas animais virêmicos, foram considerados como verdadeiramente positivos para o cálculo de sensibilidade e especificidade apenas os animais com resultados positivos concomitantes na PCR de capa leucocitária e no teste imunocromatográfico. Animais com infecção regressiva não foram considerados positivos verdadeiros pelo fato de os resultados discordarem, já que os alvos e as plataformas são distintas.

4.6.3 Coeficiente Kappa

Verificou-se o grau de concordância dos resultados obtidos em cada metodologia. Para isso, foi calculado o coeficiente Kappa (Cohen, 1960) na comparação entre a PCR de Capa Leucocitária e cada uma das PCRs avaliadas, utilizando-se das seguinte fórmula:

$$k = \frac{k1 - k2}{1 - k2}$$

Onde, K₁: é o número de resultados com mesma classificação (positivo ou negativo) e K₂: a probabilidade de ocorrência de resultados com mesma classificação associados ao acaso.

A força de concordância dos resultados do Coeficiente Kappa teve como base a interpretação sugerida por Landis and Koch (1977) onde:

Coeficiente Kappa	Força de Concordância
<0	Insignificante
0 a 0,2	Fraca
0,21 a 0,4	Razoável
0,41 a 0,6	Moderada
0,61 a 0,8	Forte
0,81 a 1,0	Quase Perfeita

Quadro 1- Intervalos de valores possíveis para o coeficiente Kappa e suas interpretações conforme Landis e Koch (1977).

4.6.4 Acurácia

Para a determinação da acurácia de cada metodologia avaliada, comparou-se os resultados obtidos em cada metodologia molecular com os da PCR de capa leucocitária (PCR CL).

Foram considerados verdadeiramente positivos aqueles resultados coincidentes com o resultado positivo pela PCR CL. Foram considerados falsos positivos, os resultados positivos pela técnica avaliada em animais negativos para a PCR CL. O mesmo ocorreu para a determinação de verdadeiramente negativos, sendo estes, os resultados coincidentes com o resultado negativo da PCR CL. Porém, quando a PCR de *swab* apresenta resultado negativo para amostras consideradas positivas na PCR CL, estes foram denominados falsos negativos.

A acurácia para cada PCR avaliada foi determinada pela fórmula:

$$\frac{VP + VN}{n}$$

Onde, VP: número verdadeiramente positivos; VN: número verdadeiramente negativo e n: número de amostras avaliadas em cada teste.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Determinar o *status* infeccioso de um gato em relação ao FeLV, requer bastante cuidado. Alguns animais, quando em contato com o *Feline leukemia virus*, conseguem aparentemente debelar a infecção por completo (infecção abortiva) ou mesmo, reduzir ou suprimir a replicação viral (infecção regressiva). Outros, porém, não conseguem inibir essa replicação viral (infecção progressiva). A capacidade do animal em responder frente a infecção viral está na sua interação com o agente infeccioso. Desafios com estirpes virais menos virulentas ou com baixas doses de agentes infecciosos podem contribuir para o controle da infecção pelo hospedeiro. No entanto, exposição à altas doses e/ou a estirpes muito virulentas podem superar a capacidade do indivíduo em responder satisfatoriamente e assim, tornar-se uma infecção produtiva. Nestes animais, a produção de novas partículas virais infecciosas é constante e elevada. Tais partículas são facilmente eliminadas junto das secreções corporais. Além de serem os principais transmissores do vírus, os animais virêmicos apresentam maior tendência a desenvolverem as doenças associadas ao FeLV. (Hartmann, 2011; Hofmann-Lehmann *et al.*, 2008; Levy, J. *et al.*, 2008; Lutz, Hans *et al.*, 2009). A redução ou completa supressão da viremia retira da circulação a proteína de capsídeo p27, principal marcador biológico de infecção e que é detectado por muitos testes imunológicos, como os imunoenaios (Hofmann-Lehmann, R. *et al.*, 2001). Por esse motivo, a realização de testes confirmatórios que busquem a presença do vírus, ou de seu material genômico, é fundamental na determinação do *status* infeccioso. Devido à alta sensibilidade e a possibilidade de quantificação da carga viral infectante, a PCR tem sido amplamente utilizada como teste de referência no diagnóstico da leucemia viral felina (Hofmann-Lehmann *et al.*, 2001; Coelho *et al.*, 2011; Chang-Fung-Martel *et al.*, 2013; Westman *et al.*, 2016a) sendo também, de grande valia para a determinação do prognóstico da doença e para o acompanhamento de tratamento, por meio de verificações periódicas da carga viral (Cattori *et al.*, 2009; Helfer-Hungerbuehler *et al.*, 2015).

Por ser uma espécie extremamente sensível a estímulos ambientais e por reagirem de forma exacerbada a eles, o manejo do paciente felino pode se tornar estressante tanto para o animal, quanto para a equipe veterinária. As respostas fisiológicas ao estresse, associadas ao laborioso trabalho de contenção do animal, fazem da coleta de sangue uma atividade difícil de ser executada, exigindo capacitação prática, e também, paciência por parte da equipe médica. Muitos procedimentos de coleta de sangue são realizados sob sedação do paciente (Westman *et al.*, 2016b), o que implica em gastos extras e riscos à saúde do animal. Apesar disso, os testes diagnósticos empregados na rotina são, quase que exclusivamente, realizados com base em sangue total, soro e/ou plasma. A coleta dos *swab* na execução deste estudo se mostrou um procedimento mais rápido, menos laborioso e muito bem aceito pelo animal, quando comparado à tradicional coleta de sangue. Isso corrobora com a observação de estudos anteriores (Gomes-Keller *et al.*, 2009). Apesar de também exigir cuidados especiais durante a manipulação, a utilização de *swab* possibilita que os próprios tutores, ou técnicos veterinários, realizem a coleta de material para diagnóstico do FeLV. Durante as coletas para este estudo, observou-se que alguns animais apresentaram incômodo ao entrarem em contato com o *swab*, principalmente quanto à manipulação da haste próximo à região do olho. No entanto, tal incômodo pode estar associado mais à reação do animal a um novo procedimento de manipulação do que à ocorrência de dor. De forma semelhante à administração de medicação e de vacinas, que podem ser facilitadas com o condicionamento do animal para tais procedimentos, o mesmo pode ser aplicado ao procedimento de coletas por *swab*. Cabe ressaltar, que a inserção do *swab* na cavidade retal do animal constituiu-se um procedimento bastante semelhante à mensuração de temperatura retal, realizada rotineiramente pelos clínicos.

5.1 AMPLIFICAÇÃO DO GENE NORMALIZADOR GAPDH E DO GENE *gag* DO FeLV

Como controle de extração e de qualidade do DNA, foi amplificado o fragmento de 709pb do gene normalizador gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), comum a todos os mamíferos (Figura 04). Todas as amostras obtidas por *swab* oral (145/145) e *swab* conjuntival (114/114) apresentaram amplificação desse fragmento de gene. Das amostras de *swab* retal, 137 apresentaram (137/145) formação da banda em

altura de 709pb, sugerindo assim, insucesso do procedimento de extração, ou mesmo, a presença de inibidores da PCR. Todo o preparo do *mix* para as reações bem como a adição do DNA a ser analisado ocorreram em instalações diferentes e seguindo dos padrões de boas práticas laboratoriais, a fim de se evitar a ocorrência de contaminações.

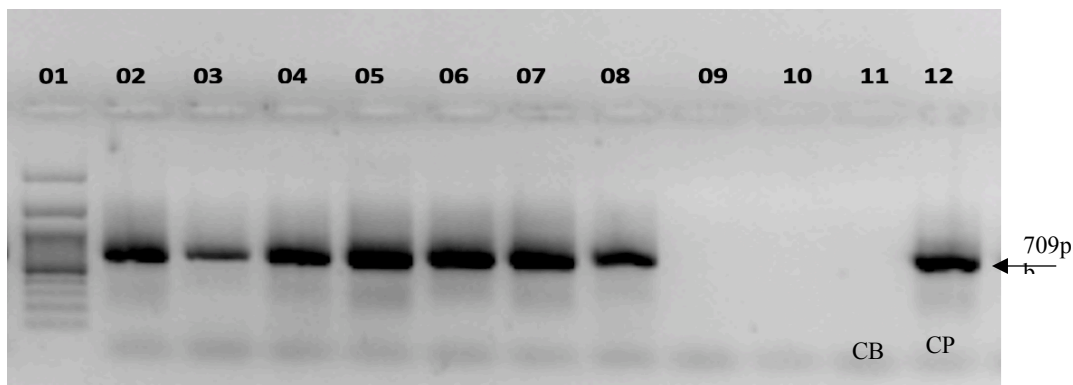


Figura 4- Eletroforese em gel de agarose 1,5% apresentando a amplificação do gene normalizador GAPDH, de 709pb, em amostras obtidas por suabe retal. Canaleta 01: marcador de tamanho molecular (100pb); canaletas 02-08: amostras positivas; canaletas 09-10: amostras negativas; canaleta 11: Controle branco (CB) (água ultrapura); canaleta 12: controle positivo (CP).

Posterior à confirmação da presença de material nucleico, todas as amostras foram submetidas a amplificação do fragmento de 450pb do gene *gag* do vírus da FeLV (Figura 05).

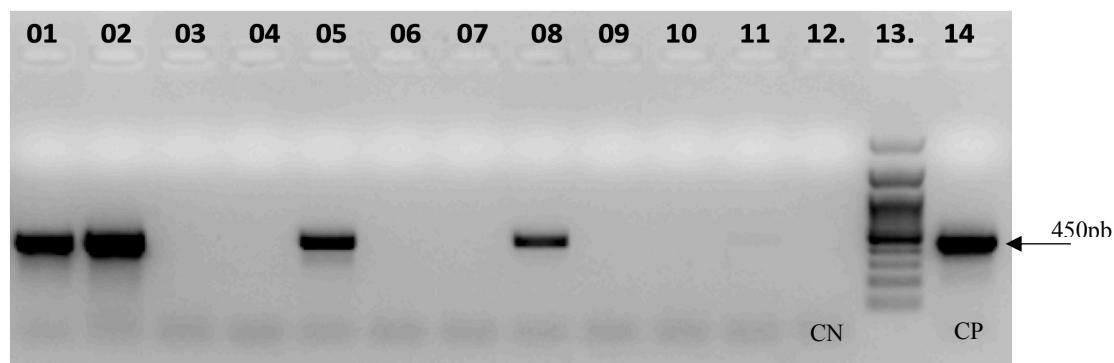


Figura 5- Eletroforese em gel de agarose 1,5% apresentando a amplificação do gene *gag* do FeLV, em altura equivalente a 450pb, de DNA extraído de capa leucocitária. Canaleta 13: marcador de tamanho molecular (100pb); Canaleta 01, 02, 05, 08 e 11: amostras positivas; canaleta 03, 04, 06, 07, 09 e 10: amostras negativas; canaleta 12: Controle negativo (CN); canaleta 14: controle positivo (CP).

A escolha das mucosas para coleta foi além da simples facilidade de acesso para o profissional veterinário ou tutor. Na avaliação das cargas viral e proviral em diferentes tecidos de animais positivos para o FeLV, Helfer-hungerbuehler *et al.* (2015) verificaram que o trato gastrointestinal, as glândulas salivares e os tecidos linfóides apresentavam as maiores cargas provirais para o FeLV, seguidos por mucosas e outras glândulas, independente do curso da infecção. Tais achados vão ao encontro dos resultados obtidos por Gomes-Keller *et al.* (2009) quanto à presença de DNA e RNA viral nas fezes de animais positivos para o FeLV. Rojko *et al.* (1979) demonstraram que a infecção das mucosas e epitélio glandular ocorre em até quatro semanas após a infecção. Dessa forma, o material celular oriundo das mucosas oral, conjuntival e retal constitui-se um valioso material para diagnóstico do FeLV. A realização do *swab* retal, apesar de ser mais invasiva do que a do *swab* oral, se mostra por sua vez, menos estressante e menos laboriosa do que a tradicional venopunção (Gomes-Keller; Gönczi *et al.*, 2006; Gomes-Keller; Tandon *et al.*, 2006; Gomes-Keller *et al.*, 2009; Lutz, Hans. e Jarrett, 1987). Foi observado que o mesmo ocorre para a coleta de material

da mucosa ocular. No conhecimento do autor, este foi o primeiro estudo que avaliou a obtenção de amostras da mucosa conjuntival para o diagnóstico da infecção pelo FeLV.

5.2 IMUNOCROMATOGRAFIA E ESTADIAMENTO DA INFECÇÃO

Amostras de soros sanguíneos de todos os animais foram submetidas à imunocromatografia com o teste SNAP FIV/FeLV combo (IDEXX Inc.) conforme orientação da fabricante. Dos 145 animais, 33 (33/145) apresentaram resultado positivo apenas para o vírus da leucemia felina, e um único animal teve resultado positivo para o FIV (1/145). Após a avaliação molecular, verificou-se que um animal (1/33) apresentou resultado falso-positivo para FeLV no teste imunocromatográfico.

Por apresentarem antigenemia detectável, os 32 animais positivos no teste rápido (confirmados por PCR de capa leucocitária), ou seja, apresentando viremia, foram classificados como portadores de infecção “progressiva”. A infecção dos animais positivos na PCR, mas negativos no teste antigenêmico (40/113) foi classificada como “regressiva” (Tabela 1). O *status* dos 73 animais restantes, negativos em ambas metodologias, foi considerado como sendo de infecção “abortiva ou nunca expostos ao vírus” (Tabela 2). Das 145 amostras de DNA da capa leucocitária avaliadas, 73 (50,34%) se apresentaram negativas e 72 positivas (49,66%) (Tabela 2). Por não ter sido realizada avaliação de anticorpos anti-FeLV neste trabalho, os animais negativos foram classificados como nunca expostos ao vírus/portadores de infecção abortiva. Dentre os positivos, 32 apresentavam viremia no momento da avaliação, correspondendo a 22,07% do total de animais (32/145), e por isso foram classificados como portadores de infecção progressiva. Os demais 27,59% (40/145) de animais positivos apresentavam apenas o DNA proviral sem antigenemia, e por isso, a infecção foi classificada como regressiva. Os resultados obtidos reforçam a importância do diagnóstico molecular para a confirmação da infecção, principalmente naqueles animais negativos no teste rápido. Não é possível comparações entre as duas plataformas de diagnóstico uma vez que o alvo de identificação em cada uma delas é diferente. No entanto, assim como a quantificação da carga viral por qPCR, a associação das duas técnicas fornece ao clínico e ao tutor do animal informações importantes a respeito do prognóstico da infecção. Um animal identificado como positivo no teste imunocromatográfico (amostra nº 180) não apresentou DNA proviral em nenhuma das PCRs utilizadas neste experimento. O que permite concluir que o teste rápido apresentou resultado falso-positivo. Apesar de ser um caso isolado, animais positivos para p27 e clinicamente saudáveis devem também serem submetidos a testes para a confirmação da infecção.

Tabela 1 – Estadiamento da infecção dos animais positivos na PCR CL.

<i>Amostra n°</i>	<i>PCR CL</i>	<i>Teste Rápido</i>	<i>Infecção</i>
5	+	-	Regressiva
10	+	-	Regressiva
30	+	-	Regressiva
54	+	-	Regressiva
57	+	-	Regressiva
58	+	-	Regressiva
59	+	-	Regressiva
62	+	-	Regressiva
71	+	-	Regressiva
72	+	-	Regressiva
73	+	-	Regressiva
74	+	-	Regressiva
75	+	-	Regressiva
79	+	-	Regressiva
80	+	-	Regressiva
90	+	-	Regressiva
104	+	-	Regressiva
118	+	-	Regressiva
121	+	-	Regressiva
128	+	-	Regressiva
130	+	-	Regressiva

131	+	-	Regressiva
133	+	-	Regressiva
135	+	-	Regressiva
136	+	-	Regressiva
142	+	-	Regressiva
145	+	-	Regressiva
146	+	-	Regressiva
149	+	-	Regressiva
150	+	-	Regressiva
160	+	-	Regressiva
161	+	-	Regressiva
163	+	-	Regressiva
164	+	-	Regressiva
169	+	-	Regressiva
173	+	-	Regressiva
177	+	-	Regressiva
178	+	-	Regressiva
188	+	-	Regressiva
4	+	+	Progressiva
6	+	+	Progressiva
11	+	+	Progressiva
16	+	+	Progressiva
31	+	+	Progressiva
36	+	+	Progressiva
37	+	+	Progressiva
40	+	+	Progressiva
43	+	+	Progressiva
48	+	+	Progressiva
49	+	+	Progressiva
56	+	+	Progressiva
60	+	+	Progressiva
76	+	+	Progressiva
91	+	+	Progressiva
103	+	+	Progressiva
109	+	+	Progressiva
134	+	+	Progressiva
137	+	+	Progressiva
138	+	+	Progressiva
139	+	+	Progressiva
140	+	+	Progressiva
141	+	+	Progressiva
148	+	+	Progressiva
151	+	+	Progressiva
155	+	+	Progressiva
157	+	+	Progressiva
158	+	+	Progressiva
167	+	+	Progressiva
168	+	+	Progressiva
171	+	+	Progressiva
194	+	+	Progressiva
180	-	+	Negativo

(+): Resultado positivo; (-): Resultado negativo;

Amostras negativas para as duas plataformas não foram aqui tabeladas.

O elevado número de animais com infecção regressiva encontrado nesse estudo (56,36%) vai de encontro ao estabelecido por Gomes-Keller *et al.* (2006). Tais autores encontraram que apenas de 5 a 10% dos animais com antigenemia indetectável possuíam o DNA proviral integrado em suas células. No entanto, os

valores encontrados aqui foram próximos aos 60% obtidos em outros estudos (Hofmann-Lehmann *et al.*, 2001; Hofmann-Lehmann *et al.*, 2007, 2008; Sykes e Hartmann, 2013).

Felinos em infecção regressiva não eliminam o vírus no ambiente e não são considerados como fontes de infecção para outros gatos (Hartmann, 2012). Isto é, por não haver produção de partículas virais, não há

Tabela 2 – Formas de apresentação da infecção na população avaliada (n = 145)

Infecção	n	%
Abortiva/ nunca expostos	73	50,34
Regressiva	40	27,59
Progressiva	32	22,07

liberação de estruturas infectantes. Durante muitas décadas, o papel epidemiológico dos animais que suprimiram a infecção foi negligenciado, principalmente pela ausência de técnicas capazes de detectá-los. Com isso, a participação do DNA proviral na transmissão do agente é ainda pouco debatida. Sabe-se por exemplo, que a transfusão sanguínea entre um doador com infecção regressiva, com apenas carga proviral detectável, e um animal susceptível, ou seja, livre do vírus, é capaz de causar a infecção deste indivíduo (Lutz, Hans *et al.*, 2009). O DNA proviral contém todas as informações genéticas necessárias para a síntese de novos vírus. A infecção de uma célula hígida ao fagocitar células infectadas já foi descrita para o *Human T-cell lymphotropic virus* (HTLV) (Jones *et al.*, 2008). Neste estudo, os autores detectaram que células dendríticas, que são células apresentadoras de antígeno presentes nas membranas mucosas e no sangue periférico, foram satisfatoriamente infectadas com o HTLV do tipo 1, quando cultivadas em meio contendo o DNA proviral. A detecção desta partícula comprovou que houve integração do material genético do agente. Para confirmar o achado, os pesquisadores repetiram o experimento e realizaram tratamento das células com inibidores da transcriptase reversa e verificaram uma redução de 95% da presença do DNA proviral. Além disso, os autores constataram que as células infectadas produziram novas partículas virais detectáveis no sobrenadante. A amplificação do DNA proviral do FeLV, oriunda do material celular obtido por *swab* das mucosas neste estudo, demonstra que o material genômico do vírus é facilmente liberado no ambiente, e pode se caracterizar como uma fonte potencial de transmissão do agente entre um indivíduo portador e um susceptível.

5.3 SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DA PCR DE *SWAB* AMOSTRAS OBTIDAS POR *SWAB*

Foram submetidas à amplificação da região *gag* do FeLV, 145 amostras obtidas da mucosa oral. Dessas, 64 apresentaram resultados positivos, e 81 resultados negativos. Dois animais obtiveram resultado positivo na PCR SO, mas negativo na PCR CL, sendo então classificados como falso-positivos (Tabela 3), e o número de falsos-negativos, que são aqueles animais negativos no PCR SO, mas positivos no PCR CL, foi igual a dez. Dessa forma, a sensibilidade da PCR de *swab* oral foi de 86,11 % e a especificidade 97,26% (Tabela 06). Dois animais apresentavam troca dentária tendo o *swab* oral contato com a ferida. Com isso, foi contaminado com sangue. Um outro animal apresentava estomatite no momento da coleta, porém não foi observado sangramento na cavidade nem contaminação dos *swab* com sangue. Estes animais não foram excluídos do experimento uma vez que isso pode reproduzir a condição de coleta a campo.

Tabela 3 – Concordância geral dos resultados entre PCR de *Swab* oral e o teste de referência (PCR Capa leucocitária)

		PCR Capa Leucocitária		Total
		Positivos	Negativos	
PCR <i>Swab</i> Oral	Positivos	62	2	64
	Negativos	10	71	81
	Total	72	73	145

Um total de 114 amostras obtidas da mucosa conjuntival foi submetido à amplificação da região *gag* do FeLV. Destas, 56 apresentaram resultado negativo, e 58 positivo. Seguindo o mesmo critério adotado para PCR SO, quatro animais obtiveram resultado falso-positivo, enquanto outros seis obtiveram resultado falso-negativo (Tabela 4). Dessa forma, a sensibilidade da PCR de *swab* conjuntival foi de 90% e a especificidade 92,59% (Tabela 06).

Tabela 4 – Concordância geral dos resultados entre PCR de *swab* conjuntival e o teste de referência (PCR Capa leucocitária)

		PCR Capa Leucocitária		
		Positivos	Negativos	Total
PCR <i>Swab</i> Conjuntival	Positivos	54	4	58
	Negativos	6	50	56
	Total	60	54	114

Das amostras de *swab* retal, oito delas não apresentaram presença de material genético após a extração. Sendo assim, foram submetidas à amplificação do FeLV, 137 amostras obtidas da mucosa retal. Destas, 85 apresentaram resultado negativo, e 52 positivos. Utilizando-se dos mesmos critérios anteriores, três animais obtiveram resultado falso-positivo, e 17 erroneamente apresentaram resultado negativo (Tabela 5). Dessa forma, a sensibilidade da PCR de *swab* retal foi de 74,24% e a especificidade 95,77% (Tabela 06).

A presença de fezes na cavidade retal, ou mesmo aderida à mucosa, pode ser um fator limitante para a técnica de coleta de material celular por meio do *swab*, uma vez que ao se aderir à região algodoada, as fezes impedem que células sejam coletadas, e assim, reduzir o volume de material ou mesmo impedir por completo a obtenção de DNA por essa via.

Tabela 5 – Concordância geral entre os resultados da PCR de *Swab* Retal e do teste de referência (PCR Capa leucocitária)

		PCR Capa Leucocitária		
		Positivos	Negativos	Total
PCR <i>Swab</i> Retal	Positivos	49	3	52
	Negativos	17	68	85
	Total	66	71	137

Tabela 6 – Sensibilidade e Especificidade de cada teste

Teste	Sensibilidade	Especificidade
PCR SO	86,11%	97,26%
PCR SR	74,24%	95,77%
PCR SC	90,00%	92,59%
Teste SNAP FIV/FeLV Combo*	97,05%	99,10%

*animais com infecção regressiva não foram considerados no cálculo.

5.4 SEQUENCIAMENTO

O sequenciamento de nucleotídeos dos *amplicons* mostrou que todas as amostras analisadas possuíam de 94% a 99% de similaridade com a sequência EU048350.1, *Feline leukemia virus strain 1172MG gag polyprotein gene*, registrada no GenBank® (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/EU048350.1>)

O resultado revelou uma similaridade variando de 94 a 99% com o isolado oriundo do município de Belo Horizonte, previamente depositada por Coelho *et al.* (2011) no GenBank. Tal concordância de resultados demonstra que o isolado viral registrado no banco de dados ainda está circulante na população desse município. Além disso, essa concordância ratifica a eficiência de diagnóstico pelas metodologias aqui avaliadas.

5.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

5.5.1 Ocorrência do FeLV na População Avaliada

Foi calculada a ocorrência do *Feline leukemia virus* na população estudada e os resultados apresentados conforme a metodologia utilizada (Tabela 7). Por ser a PCR de capa leucocitária o teste de referência utilizado, obteve-se como ocorrência do FeLV na população avaliada a taxa de 49,66%.

Tabela 7 – Ocorrência de FeLV na população estudada de acordo com o método utilizado

Teste	Negativo		Positivo		<i>n</i>
PCR Capa Leucocitária	73	(50,34%)	72	(49,66%)	145
PCR <i>Swab</i> Oral	81	(55,86%)	64	(44,14%)	145
PCR <i>Swab</i> Retal	85	(62,04%)	52	(37,96%)	137
PCR <i>Swab</i> Conjuntival	56	(49,12%)	58	(50,88%)	114
Teste SNAP FIV/FeLV Combo	112	(77,24%)	33	(22,76%)	145

A presença do material genômico do FeLV dentre os indivíduos deste estudo foi similar à ocorrência encontrada por Coelho *et al.* (2011) para o município de Belo Horizonte, Minas Gerais. O que mostra que a população avaliada apresenta a mesma tendência de positividade para o agente que o município. No entanto, a avaliação concomitante da presença de viremia, por meio da imunocromatografia, e do DNA proviral, pela PCR, permitiu o estadiamento da infecção. É importante ressaltar a diferença entre os dois estudos. A condição clínica dos animais avaliados nesse trabalho não serviu de caráter excludente para amostragem. Sendo assim, foram avaliados animais saudáveis e com queixa clínica. No estudo conduzido por Coelho e colaboradores (2011), as amostras avaliadas foram provenientes de clínicas veterinárias do município de Belo Horizonte, o que pode servir como viés uma vez que grande parte dessas amostras eram provenientes de animais doentes. Dessa forma, a ocorrência do FeLV encontrada pelos autores pode estar superestimada em relação a realidade do município no ano estudado.

5.5.2 Resultados Discordantes entre PCR-SO, PCR-SR e PCR-SC em Relação à PCR de Capa Leucocitária

Houve discordância de resultados em 29 dos animais avaliados. O resultado da PCR CL, considerada para este estudo como referência, é o que determina o verdadeiro status do animal. Dessa forma, resultados diferentes dentre um mesmo animal foram considerados falsos positivos ou falsos negativos. Em cinco animais (05, 06, 10, 59 e 62), apenas a PCR CL foi capaz de identificar a presença do DNA proviral (Tabela 8).

Tabela 8 – Resultados discordantes entre PCR SO, PCR SR e/ou PCR SC em relação à PCR CL

Amostra nº	PCR CL	PCR SO	PCR SR	PCR SC
5	+	-	NR	NR
6	+	-	NR	NR
10	+	-	-	NR
24	-	+	+	NR
34	-	-	+	-
49	+	+	-	+
50	-	-	-	+
58	+	+	-	+
59	+	-	-	-
62	+	-	-	-
72	+	+	-	+
73	+	+	-	+
74	+	-	+	-
79	+	+	-	+
80	+	-	-	-
105	-	-	+	-
106	-	+	-	-
120	-	-	-	+
124	-	-	-	+
132	-	-	-	+
133	+	+	-	+
135	+	+	-	+
141	+	+	-	+

149	+	+	-	+
155	+	-	+	+
161	+	+	-	+
163	+	+	-	+
173	+	-	+	+
177	+	+	-	+

(+): Resultado Positivo; (-): Resultado Negativo; (NR): Não Realizado.

Amostras não discordantes não foram apresentadas na tabela.

5.5.3 Concordância Entre os Testes

Baseando-se no estadiamento da doença de acordo com o resultado da PCR de capa leucocitária, avaliou-se o quanto cada metodologia aplicada foi capaz de corretamente realizar o diagnóstico (Tabela 9). Os resultados obtidos neste estudo mostram que a coleta de material dessas três mucosas apresentaram sensibilidades satisfatórias, sendo de 86,11% para *swab* oral, de 90% para o *swab* conjuntival e 74,24% para *swab* retal (Tabela 06). Mesmo nos animais com infecção regressiva, que tendem a apresentar cargas proviral moderadas ou muito baixas (Hofmann-lehmann *et al.*, 2001; Tandon *et al.*, 2008), houve concordância de resultados em 80% (32/40) para *swab* oral e em 83,78% (31/37) para *swab* conjuntival, quando comparada a PCR de capa leucocitária. No entanto, ao avaliar a concordância do *swab* retal com o teste de referência nos animais regressores, obteve-se apenas 63,15% (24/38) (Tabela 9). É importante considerar que, por não se ter quantificado a carga proviral neste estudo, os resultados falsos negativos obtidos podem ter ocorrido naqueles animais cuja carga proviral se encontrava abaixo do limite de detecção da PCR convencional de amplificação dos 450pb do gene *gag* do FeLV. Tal fato pode explicar o resultado dos cinco animais (05, 06, 10, 59 e 62), que se apresentavam positivos apenas para a PCR CL (Tabela 08).

Tabela 9 – Concordância de cada teste em relação à PCR CL estratificada por fase de infecção

Fase	n	SO	SR	SC
Negativos	73	97,26% (71/73)	95,77% (68/71)	92,59% (50/54)
Regressores	40	80,0% (32/40)	63,15% (24/38)	83,78% (31/37)
Progressores	32	93,75% (30/32)	89,28% (25/28)	100% (26/26)

n: número de amostras em cada fase de infecção; SO: PCR *swab* oral ; SR: PCR *swab* retal; SC: PCR *swab* conjuntival

No que se refere aos animais com infecção progressiva, 100% (26/26) das amostras de *swab* conjuntival avaliadas apresentaram concordância com o resultado com o teste de referência mostrando que animais virêmicos são identificados com precisão por essa metodologia. A concordância para *swab* oral foi menor, com valor de 93,75%, mas ainda extremamente satisfatório. Observou-se que para *swab* retal, a concordância de resultados com a PCR de capa de leucócitos foi a menor, 89,28% (Tabela 9). Apesar de serem valores altos, esperou-se resultados mais significativos uma vez que o trato gastrointestinal é um dos principais sítios de replicação viral (Gomes-Keller *et al.*, 2006; Gomes-Keller *et al.*, 2009). No entanto, a PCR é uma reação enzimática, e por isso, os resultados falsos negativos podem ter sido obtidos em decorrência da presença de inibidores comumente encontrados no trato gastrointestinal, como por exemplo, íons de cálcio, lipídios, sais biliares e ureia (Demeke e Jenkins, 2010; Schrader *et al.*, 2012; Wilson, 1997). Os inibidores podem também ser introduzidos durante o processamento ou extração do ácido nucleico. Resíduos de etanol e detergentes iônicos foram utilizados no protocolo de extração de DNA deste estudo. No entanto, as recomendações do fabricante foram seguidas corretamente e o mesmo tratamento foi aplicado sobre as amostras séricas. Isso permite inferir que a possível presença dos inibidores pode estar mais relacionada aos locais de obtenção da amostra do que ao processo aplicado sobre elas. A amplificação ineficiente pode ocorrer se uma quantidade insuficiente de DNA for usada ou devido a presença de inibidores no produto da extração. A presença destes inibidores pode reduzir a eficiência e/ou a reprodutibilidade da PCR contribuindo para resultados imprecisos (Demeke e Jenkins, 2010). Inibidores geralmente exercem seus efeitos por meio da interação direta com o DNA extraído mesmo ou interferindo nas DNA polimerases termoestáveis. A ligação direta à fita de DNA pode evitar a amplificação e até mesmo fazer com que o inibidor escape da etapa de purificação de inibidores que existe no processo de extração. Interações com a polimerase ocorrem pelo bloqueio desta enzima, principalmente pela quebra do Mg^{2+} , um

cofator fundamental à sua atividade enzimática (Bessetti, 2007; Demeke e Jenkins, 2010; Schrader *et al.*, 2012). Um ponto forte da técnica utilizada neste estudo é que o uso de *swab* e adição de PBS reduzem a ação da saliva sobre o DNA presente (Bessetti, 2007). Tais problemas podem ser solucionados com o uso de polimerases mais resistentes à inibição ou pelo aumento na concentração de DNA polimerase utilizada para a reação. Outra medida que pode ser usada para reduzir o efeito de inibidores sobre a reação, é a padronização das mesmas utilizando-se de uma quantidade menor de DNA no *mix* (Schrader *et al.*, 2012).

Nos animais negativos, a concordância entre a PCR CL e as dos *swab* ficaram em 97,26% para *swab* oral, 95,77% para *swab* retal e 92,59% para *swab* conjuntival (Tabela 9). Esses valores elevados de especificidade revelam que as metodologias propostas são excelentes alternativas a serem utilizadas como testes de triagem. Resultados falsos positivos dentre os animais negativos podem ter ocorrido devido a contaminações durante os processos de extração e de amplificação. No entanto, a preparação dos *mix* das PCRs deste estudo foi realizada sob os adequados procedimentos de assepsia (equipamento e operador). Além disso, a adição do DNA de cada amostra no *mix* foi realizada em instalação isolada à de preparação do *mix*.

Na determinação do Coeficiente de Kappa, que mede a concordância entre dois ou mais métodos, foram realizadas comparações entre a PCR de referência e cada uma das PCRs avaliadas. A interpretação dos valores de Kappa obtidos foi baseado no proposto por Landis e Koch (1977). Todas as três comparações realizadas mostraram que o grau de similaridade entre as metodologias propostas com a PCR de capa leucocitária é considerado quase perfeito. Isto é, são metodologias com ótimos valores de concordância ($\kappa > 0,81$). Os valores de Kappa para PCR de *Swab* Oral, PCR de *Swab* Conjuntival e PCR de *Swab* Retal foram, respectivamente, 0,89; 0,89 e 0,82, o que endossa a viabilidade e a confiabilidade da realização do diagnóstico da Leucemia Viral Felina por meio da PCR de material coletado por *swab* de mucosas. Na avaliação do coeficiente Kappa entre a PCR padrão e o teste rápido, 0,68, a concordância foi considerada como sendo forte (Tabela 10), no entanto, é importante considerar que se tratam de plataformas de diagnóstico com alvos distintos, e por isso, a comparação deve ser avaliada com cautela.

Tabela 10 – Coeficiente Kappa entre PCR de Capa Leucocitária e cada metodologia avaliada

Teste	%	Força de Concordância
PCR SO	88,96	Quase perfeita
PCR SR	82,25	Quase perfeita
PCR SC	88,92	Quase perfeita
Teste Rápido	68,24	Forte

SO: PCR *swab* oral ; SR: PCR *swab* retal; SC:PCR *swab* conjuntival

Para a confirmação dos resultados discordantes, tais amostras foram submetidas a uma nova amplificação e o resultado destas considerado como o definitivo. Esta segunda amplificação reduz as chances de os resultados estarem ligados à contaminação durante o preparo da PCR. Apesar de ser uma das causas mais prováveis, é importante que se considere a ocorrência de infecções focal/atípicas. Nestas, a liberação viral na corrente sanguínea ocorre de maneira ocasional. Dessa forma, a viremia ou mesmo infecção de outros tecidos podem estar ausentes, não ocorrendo identificação do vírus em células mononucleares pela PCR de capa leucocitária. Aliado à isso, tem se o fato de que a primeira replicação viral, após a infecção, ocorre nas tonsilas e nos linfonodos regionais da cavidade oral (Helfer-Hungerbuehler *et al.*, 2015). A presença de material genômico viral no trato gastrointestinal pode então anteceder sua presença no sangue e se constituir amostras de diagnóstico mais precoces. No entanto, essa hipótese não foi avaliada nesse estudo por não haver acompanhamento dos animais e nem a definição do momento da infecção.

Tabela 11 – Acurácia geral de cada teste em relação à PCR de Capa Leucocitária

Teste	%
PCR SO	91,72%
PCR SR	85,40%
PCR SC	91,23%

SO: PCR *swab* oral ; SR: PCR *swab* retal; SC:PCR *swab* conjuntival

6 CONCLUSÕES

Este foi o primeiro estudo que avaliou a eficiência do diagnóstico da infecção pelo FeLV por meio da reação em cadeia da polimerase em amostras oriundas de mucosas oral, retal e conjuntival. Além de facilmente aplicáveis, as elevadas sensibilidades e especificidades encontradas revelam que as técnicas propostas são excelentes alternativas à venopunção e podem ser utilizadas tanto pelo médico veterinário quanto por técnicos e tutores. A proporção de animais detectados pelo teste rápido em relação ao total de animais portadores do material genômico viral reforça a importância do diagnóstico confirmatório após a triagem. O estudo mostrou ainda que animais com infecção regressiva são capazes de eliminar no ambiente células contendo o DNA proviral do agente, revelando uma fonte de transmissão em potencial.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos mostram que a utilização de *swab* das mucosas oral, retal e conjuntival é uma ferramenta extremamente promissora para o diagnóstico da leucemia viral felina, principalmente em animais com infecção progressiva. No entanto, melhorias na metodologia podem ser realizadas. O kit utilizado aqui para a extração de DNA total não abrange extração de material nucleico em matéria fecal, e assim, a utilização de um kit específico para esse tipo de amostra pode resultar em uma melhora no produto extraído, na presença de fezes no *swab*. Tal medida pode incorrer em melhoria nos valores de sensibilidade e de especificidade no diagnóstico por *swab* retal. Um outro fator limitante na utilização de *swab* é que, pela metodologia aplicada, pouco ou nenhum material coletado fica disponível para uma nova avaliação. Após as centrifugações, 200 μ L da suspensão de material celular em solução salina são utilizados conforme orientação do fabricante do *kit* de extração. Porém, o volume remanescente no interior dos microtubos após a retirada das hastes é variável, em decorrência da retenção de líquido intrínseca ao material da região algodoada do próprio *swab*. A coleta em duplicata torna-se então uma alternativa valiosa quando se deseja manter uma contraprova. Tendo em mente que as informações contidas no DNA proviral são a base da replicação viral, torna-se fundamental a realização de estudos mais aprofundados sobre a possível transmissão do FeLV por meio células carreadoras do genoma, especialmente em animais susceptíveis, tais como filhotes, gestantes e/ou imunossuprimidos.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

- ABINPET - Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação. Disponível em: <<http://abinpet.org.br/imprensa/noticias/abinpet-divulgadados-mercado-pet-2013>> - Acesso em 20 de outubro de 2018.
- ALMEIDA, N. R. *Ocorrência da infecção pelo Vírus da Leucemia Felina (FeLV) em gatos domésticos do município do Rio de Janeiro e Baixada Fluminense e análise dos fatores de risco para a infecção*. 2009. 1–32 f. 2009. Disponível em: <http://www.bdt.ufrj.br/tde_arquivos/6/TDE-2009-08-07T083833Z-690/Publico/2009 - Nadia Rossi de Almeida.pdf>.
- ANAI, Y.; OCHI, H.; WATANABE, S.; NAKAGAWA, S.; *et al.* Infectious Endogenous Retroviruses in Cats and Emergence of Recombinant Viruses. *Journal of Virology*, 86(16), p. 8634–8644, 2012.
- ANDERSON, M. M.; LAURING, A. S.; BURNS, C. C.; OVERBAUGH, J. Identification of a Cellular Cofactor Required for Infection by Feline Leukemia Virus. 287(5459), p. 1828–1830, 2000.
- ARJONA, A.; ESCOLAR, E.; SOTO, I.; BARQUERO, N.; *et al.* Seroepidemiological survey of infection by feline leukemia virus and immunodeficiency virus in Madrid and correlation with some clinical aspects. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(9), p. 3448–3449, 2000.
- ARMSTRONG, P. J.; BLANCHARD, G. Hepatic Lipidosis in Cats. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*, 39(3), p. 599–616, 2009.
- BANDE, F.; ARSHAD, S. S.; HASSAN, L.; ZAKARIA, Z. Molecular detection, phylogenetic analysis, and identification of transcription motifs in feline leukemia virus from naturally infected cats in Malaysia. *Veterinary Medicine International*, 2014, p. 1–10, 2014.
- BESSETTI, J. An Introduction to PCR Inhibitors. *Promega Notes*, p. 9–10, 2007.
- BOEKE, J.; STOYE, J. Endogenous Retroviruses, and the Evolution of Retroelements. *Retroviruses*, 5(8), p. 313–318, 1997.
- BREMNER, J. D.; KRYSTAL, J. H.; SOUTHWICK, S. M.; CHARNEY, D. S. Noradrenergic mechanisms in stress and anxiety: I. Preclinical studies. [Review] [138 refs]. *Synapse*, 23(1), p. 28–38, 1996.
- BROWN, M. A.; CUNNINGHAM, M. W.; ROCA, A. L.; TROYER, J. L.; *et al.* *Genetic characterization of Feline Leukemia Virus from Florida Panthers*. [S.l: s.n.], 2008
- BUFFINGTON, C. A. T. Idiopathic cystitis in domestic cats-beyond the lower urinary tract. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 25(4), p. 784–796, 2011.
- CAMERON, M. E.; CASEY, R. A.; BRADSHAW, J. W. S.; WARAN, N. K.; *et al.* A study of environmental and behavioural factors that may be associated with feline idiopathic cystitis. *Journal of Small Animal Practice*, 45(3), p. 144–147, 2004.
- CANEY, S. Feline leukaemia virus: an update. *In Practice*, 22(7), p. 397–404, 2000.
- CATTORI, V.; TANDON, R.; PEPIN, A.; LUTZ, H.; *et al.* Rapid detection of feline leukemia virus provirus integration into feline genomic DNA. *Molecular and Cellular Probes*, 20(3–4), p. 172–181, 2006.
- CATTORI, V.; PEPIN, A. C.; TANDON, R.; RIOND, B.; *et al.* Real-time PCR investigation of feline leukemia virus proviral and viral RNA loads in leukocyte subsets. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 123(1–2), p. 124–128, 2008.
- CATTORI, V.; TANDON, R.; RIOND, B.; PEPIN, A. C.; *et al.* The kinetics of feline leukaemia virus shedding in experimentally infected cats are associated with infection outcome. *Veterinary Microbiology*, 133(3), p. 292–296, 2009.
- CHANG-FUNG-MARTEL, J.; GUMMOW, B.; BURGESS, G.; FENTON, E.; *et al.* A door-to-door prevalence study of feline immunodeficiency virus in an Australian suburb. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 15(12), p. 1070–1078, 2013.
- CHIU, E. S.; HOOVER, E. A.; VANDEWOUDE, S. A retrospective examination of feline leukemia subgroup characterization: Viral interference assays to deep sequencing. *Viruses*, 10(1), 2018.
- COELHO, F. M.; MAIA, M. Q.; LUPPI, M. M.; COSTA, E. A.; *et al.* Ocorrência do vírus da leucemia felina em *Felis catus* em Belo Horizonte. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 63(3), p. 778–783, 2011.

- COHEN, J. A Coefficient of Agreement for Nominal Scales. *Educational and Psychological Measurement*, 1960.
- CONG, W.; MENG, Q. F.; BLAGA, R.; VILLENA, I.; *et al.* Toxoplasma gondii, Dirofilaria immitis, feline immunodeficiency virus (FIV), and feline leukemia virus (FeLV) infections in stray and pet cats (Felis catus) in northwest China: co-infections and risk factors. *Parasitology Research*, 115(1), p. 217–223, 2016.
- CUNNINGHAM, M. W.; BROWN, M. A.; SHINDLE, D. B.; TERRELL, S. P.; *et al.* Epizootiology and Management of Feline Leukemia Virus in the Florida Puma. *Journal of Wildlife Diseases*, 44(3), p. 537–552, 2008.
- DEMEKE, T.; JENKINS, G. R. Influence of DNA extraction methods, PCR inhibitors and quantification methods on real-time PCR assay of biotechnology-derived traits. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 396(6), p. 1977–1990, 2010.
- DUNHAM, S. P.; GRAHAM, E. Retroviral Infections of Small Animals. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*, 38(4), p. 879–901, 2008.
- ENCK, P.; HOLTSMANN, G. Stress and gastrointestinal motility in animals: a review of the literature. *Journal Gastrointestinal Motility*, 1, p. 83–90, 1992.
- FINOKETTI, F. *Ocorrência dos vírus da imunodeficiência felina (FIV) e leucemia felina (FeLV) em felinos no município de Porto Alegre*. 2011. 37 f. UFRGS, 2011. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/10183/142816>>.
- FLYNN, J. N.; HANLON, L.; RETROVIRUS, O. J.; PATHOLOGY, V. Feline leukaemia virus: protective immunity is mediated by virus-specific cytotoxic T lymphocytes. *Immunology*, 101(1), p. 120–125, 2000.
- FRANCIS, D. ; ESSEX, M.; HARDY, J. Excretion of feline leukaemia virus by naturally infected pet cats. *Nature*, 270, p. 673–678, 1977.
- FRANKLIN, S. P.; KAYS, R. W.; MORENO, R.; TERWEE, J. A.; *et al.* Ocelots on Barro Colorado Island Are Infected with Feline Immunodeficiency Virus but Not Other Common Feline and Canine Viruses. *Journal of Wildlife Diseases*, 44(3), p. 760–765, 2008.
- GAN, S. D.; PATEL, K. R.; ELISA, S. Enzyme Immunoassay and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Journal of Investigative Dermatology*, 133(9), p. 1–3, 2013.
- GLEICH, S. E.; KRIEGER, S.; HARTMANN, K. Prevalence of feline immunodeficiency virus and feline leukaemia virus among client-owned cats and risk factors for infection in Germany. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 11(12), p. 985–992, 2009.
- GOMES-KELLER, M. A.; GÖNCZI, E.; TANDON, R.; RIONDATO, F.; *et al.* Detection of Feline Leukemia Virus RNA in Saliva from Naturally Infected Cats and Correlation of PCR Results with Those of Current Diagnostic Methods. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(3), p. 916 LP – 922, 2006b.
- GOMES-KELLER, M. A.; GÖNCZI, E.; GREINACHER, B.; TANDON, R.; *et al.* Fecal shedding of infectious feline leukemia virus and its nucleic acids: A transmission potential. *Veterinary Microbiology*, 134(3–4), p. 208–217, 2009.
- GOMES-KELLER, M. A.; TANDON, R.; GÖNCZI, E.; MELI, M. L.; *et al.* Shedding of feline leukemia virus RNA in saliva is a consistent feature in viremic cats. *Veterinary Microbiology*, 112(1), p. 11–21, 2006a.
- GRIFFIN, J. F. T. *Stress and immunity: A unifying concept*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. [S.l.: s.n.], 1989
- GUIMARAES, A. M. S.; BRANDÃO, P. E.; DE MORAES, W.; CUBAS, Z. S.; *et al.* Survey of Feline Leukemia Virus and Feline Coronaviruses in Captive Neotropical Wild Felids from Southern Brazil. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 40(2), p. 360–364, 2009.
- HARDY, J.; LÉVEILLÉ, R. Diseases of the guttural pouches. *Veterinary Clinics of North America - Equine Practice*, 19(1), p. 123–158, 2003.
- HARDY, W. D.; OLSEN, R. G.; SCHALLER, J. P.; MATHES, L. E. Feline leukemia virus infection: Age-related variation in response of cats to experimental infection. *Journal of the National Cancer Institute*, 57(2), p. 365–369, 1976.
- HARDY, W. D.; MCCLELLAND, A. J.; ZUCKERMAN, E. E.; HESS, P. W.; *et al.* Prevention of the contagious spread of feline leukaemia virus and the development of leukaemia in pet cats. *Nature*, 263, p. 619–326–328, 1976.
- HARTMANN, K. Clinical aspects of feline immunodeficiency and feline leukemia virus infection. *Veterinary Immunology*

and *Immunopathology*, 143(3–4), p. 190–201, 2011.

HARTMANN, K. Clinical aspects of feline retroviruses: A review. *Viruses*, 4(11), p. 2684–2710, 2012a.

HARTMANN, K.; WERNER, R. M.; EGBERINK, H.; JARRETT, O. Comparison of six in-house tests for the rapid diagnosis of feline immunodeficiency and feline leukaemia virus infections. *Veterinary Record*, 149(11), p. 317–320, 2001.

HARTMANN, K. Feline Leukemia Virus Infection. In: GREENE, C. E. (Org.). *Infectious Diseases of the Dog and the Cat*. 4th. ed. [S.l.]: Elsevier Health Science, 2012b. p. 108–149.

HARTMANN, K.; GRIESSMAYR, P.; SCHULZ, B.; GREENE, C. E.; *et al.* Quality of different in-clinic test systems for feline immunodeficiency virus and feline leukaemia virus infection. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 9(6), p. 439–445, 2007.

HAYES, K. A.; ROJKO, J. L.; TARR, M. J.; POLAS, P. J.; *et al.* Atypical localised viral expression in a cat with feline leukaemia. *The Veterinary record*, 1989.

HELPER-HUNGERBUEHLER, A. K.; WIDMER, S.; KESSLER, Y.; RIOND, B.; *et al.* Long-term follow up of feline leukemia virus infection and characterization of viral RNA loads using molecular methods in tissues of cats with different infection outcomes. *Virus Research*, 197, p. 137–150, 2015.

HELPER-HUNGERBUEHLER, A. K.; SPIRI, A. M.; RIOND, B.; GREST, P.; *et al.* No benefit of therapeutic vaccination in clinically healthy cats persistently infected with feline leukemia virus. *Vaccine*, 33(13), p. 1578–1585, 2015.

HOFMANN-LEHMANN, R.; HUDER, J. B.; GRUBER, S.; BORETTI, F.; *et al.* Feline leukaemia provirus load during the course of experimental infection and in naturally infected cats. *Journal of General Virology*, 82(7), p. 1589–1596, 2001.

HOFMANN-LEHMANN, REGINA; CATTORI, V.; TANDON, R.; BORETTI, F. S.; *et al.* How molecular methods change our views of FeLV infection and vaccination. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 123(1–2), p. 119–123, 2008.

HOFMANN-LEHMANN, REGINA; TANDON, R.; BORETTI, F. S.; MELI, M. L.; *et al.* Reassessment of feline leukaemia virus (FeLV) vaccines with novel sensitive molecular assays. *Vaccine*, 24(8), p. 1087–1094, 2006.

HOFMANN-LEHMANN, REGINA; CATTORI, V.; TANDON, R.; BORETTI, F. S.; *et al.* Vaccination against the feline leukaemia virus: Outcome and response categories and long-term follow-up. *Vaccine*, 25(30 SPEC. ISS.), p. 5531–5539, 2007.

HOOVER, E.; MULLINS, J.; QUACKENBUSH, S.; GASPE, P. Experimental transmission and pathogenesis of immunodeficiency syndrome in cats. *Blood Journal*, 70(6), p. 1880–1892, 1987.

HOOVER, E. A.; KOCLBA, G. J.; HARDY, W. D.; YOHN, D. S. Erythroid Hypoplasia in Cats Inoculated With Feline Leukemia Virus 1, 2. 53(5), p. 1271–1276, 1974.

HOOVER, E. A.; MULLINS, J. I. Feline leukemia virus infection and diseases. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 199, p. 1287–1297, 1991.

HOSIE, M. J.; ROBERTSON, C.; JARRETT, O. Prevalence of feline leukaemia virus and antibodies to feline immunodeficiency virus in cats in the United Kingdom. *The Veterinary record*. [S.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2554556>>. , 1989

ITO, J.; WATANABE, S.; HIRATSUKA, T.; KUSE, K.; *et al.* Refrex-1, a Soluble Restriction Factor against Feline Endogenous and Exogenous Retroviruses. *Journal of Virology*, 87(22), p. 12029–12040, 2013.

JARRETT, O.; HARDY, W. D.; GOLDBERGER, M. C.; HAY, D. The frequency of occurrence of feline leukaemia virus subgroups in cats. *International Journal of Cancer*, 21(3), p. 334–337, 1978.

JARRETT, W. F.; CRAWFORD, E. M.; MARTIN, W. B.; DAVIE, F. Leukæmia in the Cat: A Virus-like Particle associated with Leukæmia (Lymphosarcoma). 202(4932), p. 567–568, 1964.

JONES, K. S.; PETROW-SADOWSKI, C.; HUANG, Y. K.; BERTOLETTE, D. C.; *et al.* Cell-free HTLV-1 infects dendritic cells leading to transmission and transformation of CD4+ T cells. *Nature Medicine*, 14, p. 429, 2008.

LAMBERT, G. P. Stress-induced gastrointestinal barrier dysfunction and its inflammatory effects. *Journal of animal science*, 87, p. 101–108, 2009.

- LANDIS, J. R.; KOCH, G. G. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*, 1977.
- LEVY, J.; CRAWFORD, C.; HARTMANN, K.; HOFMANN-LEHMANN, R.; *et al.* 2008 American Association of Feline Practitioners' feline retrovirus management guidelines. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 10(3), p. 300–316, 2008.
- LEVY, J. K.; SCOTT, H. M.; LACHTARA, J. L.; CRAWFORD, P. C. Seroprevalence of feline leukemia virus and feline immunodeficiency virus infection among cats in North America and risk factors for seropositivity. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 228(3), p. 371–376, 2006.
- LEVY, L. S.; GARDNER, M. B.; CASEY, J. W. Isolation of a feline leukaemia provirus containing the oncogene myc from a feline lymphosarcoma. *Nature*, 1984.
- LITTLE, S. A review of feline leukemia virus and feline immunodeficiency virus seroprevalence in cats in Canada. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 143(3–4), p. 243–245, 2011a.
- LITTLE, S. *The Cat: Clinical Medicine and Management*. 1. ed. [S.l.]: Saunders, 2011b.
- LUACES, I.; DOMENECH, A.; GARCÍA-MONTIJANO, M.; COLLADO, V. M.; *et al.* Detection of Feline leukemia virus in the endangered Iberian lynx (*Lynx pardinus*) ' a-Montijano, Victorio M. Collado, Celia Sa Ine ' s Luaces, Ana Dome ' nech, Marino Garcı J. German Tejerizo, Margarita Galka, Pilar Ferna ' ndez, Esperanza Go. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 385, p. 381–385, 2008.
- LUTZ; HÜBSCHER, U.; HIGGINS, J.; THEILEN, G. H. Humoral Immune Reactivity to Feline Leukemia Virus and Associated Antigens in Cats Naturally Infected with Feline Leukemia Virus. *Cancer Research*, 1980.
- LUTZ, H.; PEDERSEN, N. C.; THEILEN, G. H. Course of feline leukemia virus infection and its detection by enzyme-linked immunosorbent assay and monoclonal antibodies. *American journal of veterinary research*, 44, p. 2054–2059, 1983.
- LUTZ, HANS.; JARRETT, O. Detection of feline leukemia virus infection in saliva. *J Clin Microbiol*, 25(5), p. 827–831, 1987.
- LUTZ, HANS; ADDIE, D.; BELÁK, S.; BOUCRAUT-BARALON, C.; *et al.* Feline leukaemia ABCD guidelines on prevention and management. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 11(7), p. 565–574, 2009.
- MACKEY, L.; JARRETT, W.; JARRETT, O.; LAIRD, H. Anemia associated with feline leukemia virus infection in cats. *Journal of the National Cancer Institute*, 54(1), p. 209–217, 1975.
- MAJOR, A.; CATTORI, V.; BOENZLI, E.; RIOND, B.; *et al.* Exposure of cats to low doses of FeLV: seroconversion as the sole parameter of infection. *Veterinary research*, 41(2), p. 17, 2010.
- MAKUNDI, I.; KOSHIDA, Y.; KUSE, K.; HIRATSUKA, T.; *et al.* Epidemiologic survey of feline leukemia virus in domestic cats on Tsushima Island, Japan: management strategy for Tsushima leopard cats. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 29(6), p. 889–895, 2017.
- MARKER, L.; MUNSON, L.; BASSON, P. A.; QUACKENBUSH, S. Multicentric T-cell Lymphoma Associated with Feline Leukemia Virus infection in a Captive Namibian Cheetah (*Acinonyx jubatus*). *Journal of Wildlife Diseases*, 39(3), p. 690–695, 2003.
- MARUYAMA, S.; KABEYA, H.; NAKAO, R.; TANAKA, S.; *et al.* Seroprevalence of Bartonella henselae, Toxoplasma gondii, FIV and FeLV infections in domestic cats in Japan. *Microbiology and Immunology*, 47(2), p. 147–153, 2003.
- MEDRONHO, R. DE A.; PEREZ, M. DE A. Testes Diagnósticos. *Epidemiologia*, 2008.
- MEINERZ, A. R. M.; ANTUNES, T. D. Á.; DE SOUZA, L. L.; NASCENTE, P. D. S.; *et al.* Frequência do Vírus da Leucemia Felina (VLFe) em felinos doméstico (*Felis catus*) semidomiciliados nos municípios de Pelota e Rio Grande. *Ciência Animal Brasileira*, 11(1), p. 1997–1999, 2010.
- MELI, M. L.; CATTORI, V.; MARTÍNEZ, F.; LÓPEZ, G.; *et al.* Feline leukemia virus and other pathogens as important threats to the survival of the critically endangered Iberian lynx (*Lynx pardinus*). *PLoS ONE*, 4(3), 2009.
- MIKAYE, A.; WATANABE, S.; HIRATSUKE, T.; ITO, J.; *et al.* Novel Feline Leukemia Virus Interference Group Based on the. *American Society For Microbiology*, 90(9), p. 4832–4837, 2016.
- MIYAZAWA, T. Infections of feline leukemia virus and feline immunodeficiency virus. *Frontiers in Bioscience*, 7(1–3), p.

d504, 2002.

MOBERG, G. P. Biological response to stress: implications for animal welfare. *The biology of animal stress: basic principles and implications for animal welfare*. [S.l.: s.n.], 2009. .

MUIRDEN, A. Prevalence of feline leukaemia virus and antibodies to feline immunodeficiency virus and feline coronavirus in stray cats sent to an RSPCA hospital. *Veterinary Record*, 150(20), p. 621–625, 2002.

NESINA, S.; HELFER-HUNGERBUEHLER, A. K.; RIOND, B.; BORETTI, F. S.; *et al.* Retroviral DNA--the silent winner: blood transfusion containing latent feline leukemia provirus causes infection and disease in naïve recipient cats. *Retrovirology*, 12, p. 105, 2015.

OSTROWSKI, S.; VAN VUUREN, M.; LENAIN, D. M.; DURAND, A. A Serologic Survey of Wild Felids from Central West Saudi Arabia. *Journal of Wildlife Diseases*, 39(3), p. 696–701, 2003.

OVERBAUGH, J.; DONAHUE, P. R.; QUACKENBUSH, S. L.; HOOVER, E. A.; *et al.* Molecular cloning of a feline leukemia virus that induces fatal immunodeficiency disease in cats. *Science*, 239(4842), p. 906–910, 1988.

PACITTI, A. M.; JARRETT, O.; HAY, D. Transmission of Feline leukaemia virus in the milk of a non-viremic cat. *Veterinary Record*, 118, p. 381–384, 1986.

PHIPPS, A. J.; HAYES, K. A.; AL-DUBAIB, M.; ROY-BURMAN, P.; *et al.* Inhibition of Feline Leukemia Virus Subgroup A Infection by Coinoculation with Subgroup B. 47, p. 40–47, 2000.

POLANI, S.; ROCA, A. L.; ROSENSTEEL, B. B.; KOLOKOTRONIS, S. O.; *et al.* Evolutionary dynamics of endogenous feline leukemia virus proliferation among species of the domestic cat lineage. *Virology*, 405(2), p. 397–407, 2010.

POWERS, J. A.; CHIU, E. S.; KRABERGER, S. J.; ROELKE-PARKER, M.; *et al.* Feline leukemia virus disease outcomes in a domestic cat breeding colony: Relationship to endogenous FeLV and other chronic viral infections. *Journal of Virology*, 92(18), p. JVI.00649-18, 2018.

RIEDEL, N.; HOOVER, E. A.; GASPER, P. W.; NICOLSON, M.; *et al.* Molecular Analysis and Pathogenesis of the feline Aplastic Anemia Retrovirus, Feline Leukemia Virus C-SARMA. *Journal of virology*, 60(1), p. 242–250, 1986.

RODAN, I. Understanding Feline Behavior and Application for Appropriate Handling and Management. *Topics in Companion Animal Medicine*, 25(4), p. 178–188, 2010.

ROJKO, J. L.; HOOVER, E. A.; MATHES, L. E.; OLSEN, R. G.; *et al.* Pathogenesis of experimental feline leukemia virus infection. *Journal of the National Cancer Institute*, 63(3), p. 759–768, 1979.

RUSSELL, P. H.; JARRETT, O. The specificity of neutralizing antibodies to feline leukaemia viruses. *International Journal of Cancer*, 21(6), p. 768–778, 1978.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1977.

SARMA, P. S.; LOG, T. Subgroup classification of feline leukemia and sarcoma viruses by viral interference and neutralization tests. *Virology*, 54(1), p. 160–169, 1973.

SCHRADER, C.; SCHIELKE, A.; ELLERBROEK, L.; JOHNE, R. PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. *Journal of Applied Microbiology*, 113(5), p. 1014–1026, 2012.

SLEEMAN, J. M.; KEANE, J. M.; JOHNSON, J. S.; BROWN, R. J.; *et al.* Feline Leukemia Virus in a Captive Bobcat. *Journal of Wildlife Diseases*, 37(1), p. 194–200, 2001.

SOBRINHO, L. S. V.; VIDES, J. P.; BRAGA, E. T.; GOMES, A. A. D.; *et al.* Sorofreqüência de infecção pelo vírus da imunodeficiência felina e vírus da leucemia felina em gatos do município de Araçatuba, São Paulo. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, 48(5), p. 378–383, 2011.


STELLA, J. L.; LORD, L. K.; BUFFINGTON, C. A. T. Sickness behaviors in response to unusual external events in healthy cats and cats with feline interstitial cystitis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 238, p. 67–73, 2011.

SYKES, J. E.; HARTMANN, K. *Feline Leukemia Virus Infection*. [S.l.]: Elsevier Inc., 2013. v. 1964. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/B978-1-4377-0795-3.00022-3>>.

- TANAKA, A.; WAGNER, D. C.; KASS, P. H.; HURLEY, K. F. Associations among weight loss, stress, and upper respiratory tract infection in shelter cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 2012.
- TANDON, R.; CATTORI, V.; PEPIN, A. C.; RIOND, B.; *et al.* Association between endogenous feline leukemia virus loads and exogenous feline leukemia virus infection in domestic cats. *Virus Research*, 135(1), p. 136–143, 2008.
- TANDON, R.; CATTORI, V.; WILLI, B.; LUTZ, H.; *et al.* Quantification of endogenous and exogenous feline leukemia virus sequences by real-time PCR assays. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 123(1–2), p. 129–133, 2008.
- TEIXEIRA, B. M.; RAJÃO, D. S.; HADDAD, J. P. A.; LEITE, R. C.; *et al.* Ocorrência do vírus da imunodeficiência felina e do vírus da leucemia felina em gatos domésticos mantidos em abrigos no município de Belo Horizonte. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 59(4), p. 939–942, 2007.
- TORRES, A. N.; O'HALLORAN, K. P.; LARSON, L. J.; SCHULTZ, R. D.; *et al.* Development and application of a quantitative real-time PCR assay to detect feline leukemia virus RNA. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 123(1–2), p. 81–89, 2008.
- TORRES, A. N.; MATHIASON, C. K.; HOOVER, E. A. Re-examination of feline leukemia virus : host relationships using real-time PCR. *Virology*, 332, p. 272–283, 2005.
- VOBIS, M.; D'HAESE, J.; MEHLHORN, H.; MENCKE, N. Evidence of horizontal transmission of feline leukemia virus by the cat flea (*Ctenocephalides felis*). *Parasitology Research*, 91(6), p. 467–470, 2003.
- WESTMAN, M. E.; MALIK, R.; HALL, E.; SHEEHY, P. A.; *et al.* Comparison of three feline leukaemia virus (FeLV) point-of-care antigen test kits using blood and saliva. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 50, p. 88–96, 2016.
- WESTMAN, M. E.; MALIK, R.; HALL, E.; SHEEHY, P. A.; *et al.* Determining the feline immunodeficiency virus (FIV) status of FIV-vaccinated cats using point-of-care antibody kits. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 42, p. 43–52, 2015.
- WESTMAN, M. E.; MALIK, R.; HALL, E.; NORRIS, J. M. Diagnosing feline immunodeficiency virus (FIV) infection in FIV-vaccinated and FIV-unvaccinated cats using saliva. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 46, p. 66–72, 2016.
- WILLETT, B. J.; HOSIE, M. J. Feline leukaemia virus: Half a century since its discovery. *Veterinary Journal*, 195(1), p. 16–23, 2013.
- WILSON, I. G. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(10), p. 3741–3751, 1997.

9 ANEXOS

9.1 PROTOCOLO DE ACEITE – COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Prezado(a):

Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.

Protocolo CEUA: 384/2017
Título do projeto: DIAGNÓSTICO MOLECULAR PARA LEISHMANIOSE FELINA
Finalidade: Pesquisa
Pesquisador responsável: Adriane Pimenta da Costa Val Bicalho
Unidade: Escola de Veterinária
Departamento: Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária

Situação atual: [Decisão Final - Aprovado](#)

Aprovado na reunião do dia 26/03/2018. Validade: 26/03/2018 à 25/03/2023

Belo Horizonte, 26/03/2018.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG
https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

Universidade Federal de [Minas Gerais](#)
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - ceua@prpq.ufmg.br