

Bruno Marques Teixeira

T636.089 69

T2660

2005



**OCORRÊNCIA DA INFECÇÃO PELO VÍRUS DA
IMUNODEFICIÊNCIA FELINA E DA LEUCEMIA FELINA EM GATOS
DE BELO HORIZONTE, MINAS GERAIS**

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

Área: Medicina Veterinária Preventiva

Orientador: Prof. Jenner Karlisson Pimenta dos Reis

Belo Horizonte
UFMG – Escola de Veterinária
2005

413172

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA

07/08/06

1323906-06



T266o Teixeira, Bruno Marques, 1977-

Ocorrência da infecção pelo vírus da imunodeficiência felina e da leucemia felina em gatos de Belo Horizonte, Minas Gerais / Bruno Marques Texeira. – 2005.

45 p. :il.

Orientador: Jenner Karlisson Pimenta dos Reis
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais,
Escola de Veterinária
Inclui bibliografia

1. Gato – Doenças – Teses. 2. Vírus da leucemia felina – Teses. 3. Vírus da imunodeficiência em felino – Teses. 4. Reação em cadeia de polimerase – Teses. I. Reis, Jenner Karlisson Pimenta dos. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 636.808 96

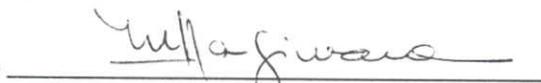
Dissertação defendida e aprovada em 20 de maio de 2005, pela Comissão Examinadora constituída por:



Prof. Jenner Karlisson Pimenta dos Reis
(orientador)



Profa. Isabella Bias Fortes Ferraz



Profa. Mitika Kuribayashi Hagiwara



Prof. Rômulo Cerqueira Leite

**Aos meus companheiros João Gabriel Teixeira e Márcia Marques Teixeira, amores,
amigos de todas as horas e porto seguro, dedico este trabalho.**

“Vim para que tenham vida e a tenham com abundância”.

João 10,10.

“Deus quer, o homem sonha, a obra nasce.”

Fernando Pessoa

“Faça as coisas o mais simples que você puder, porém, não as mais simples.”

Albert Einstein

“O vau do mundo é a alegria!”

“O correr da vida embrulha tudo, a vida é assim: esquenta e esfria, aperta e daí afrouxa, sossega e depois desinquieta. O que ela quer da gente é coragem. O que Deus quer é ver a gente aprendendo a ser capaz de ficar alegre a mais, no meio da alegria, e inda mais alegre ainda o meio da tristeza!”

***João Guimarães Rosa
Grande Sertão: Veredas, 1956.***

AGRADECIMENTOS

Planejar um agradecimento talvez tenha sido o mais difícil da dissertação. Olhar para trás e lembrar a trajetória percorrida nos remete a muitos acontecimentos, histórias e pessoas, sem as quais esta pesquisa não seria a mesma. Rever o caminho trilhado suscita um conjunto de sentimentos: a alegria do dever cumprido; a saudade precipitada de um período determinante; a expectativa de novos projetos; a gratidão para com aqueles com quem compartilhei este momento marcante. Portanto, ao chegar ao final, gostaria de deixar registrado meus agradecimentos a todos aqueles que, de alguma maneira, contribuíram para que esse projeto se tornasse possível.

A meu orientador, Jenner, meus sinceros agradecimentos pelos ensinamentos, pelo acompanhamento e pela paciência com que trilhou toda trajetória comigo.

Aos meus pais, João Gabriel e Márcia, pela base emocional e afetiva que sempre me fortaleceu para seguir em frente, sobretudo diante de novos desafios. Pelo orgulho e alegria com que compartilham comigo as conquistas e o amor e a solidariedade com que me acolhem nos momentos difíceis. A meu pai, em especial, pelo companheirismo e dedicação com que acompanhou a etapa final desta dissertação e o modo com que me ajudou a vencer. Aos meus irmãos, Tiago, André e Núbia, pelo apoio, carinho, amizade, compreensão e exemplos. Especialmente, ao Negão por ceder o seu cantinho e sua máquina. Se, hoje, concretizo essa pesquisa, devo dividir os méritos desta conquista com vocês que valorizam o direito e o dever de sonhar. Viva a qualidade de vida! Enfim, a toda a minha família – avó, pais, irmãos, sobrinho, cunhadas, tios, tias e primos – alicerce fundamental desta vitória. João, sobrinho querido, sua chegada iluminou a fase final desta pesquisa.

A Lila, acalanto no final da dissertação, pela paciência, compreensão, disponibilidade e carinho.

Sincero agradecimento ao Professor Alan Lane de Melo e todos os membros do Laboratório de Taxonomia e Biologia de Invertebrados, do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG do ano de 1997, pelas preciosas orientações na minha primeira etapa acadêmica e por apresentar esta minha grande paixão, a pesquisa.

Ao Professor Rômulo Cerqueira Leite pelos auxílios, sugestões e exemplos.

Aos Professores do mestrado, por terem contribuído na minha formação docente. Em especial à Zélia, Wandrey, Rúbens e Ivan, pelas disciplinas específicas e pelas ricas contribuições as quais foram fundamentais para o enriquecimento desta pesquisa e da minha formação.

Ao Professor João Paulo Haddad, pela orientação estatística neste trabalho.

Aos colegas de mestrado pelos já saudosos momentos de convívio.

Aos amigos, Juliano Cezar, Eros Bruno e André Queiroz, pela amizade e solidariedade que balizou nossas relações. E pela oportunidade de dividirmos descobertas, inquietações, discussões, expectativas, angústias e pelo amadurecimento que alcançamos juntos.

A todos os membros do Laboratório de Retrovíruses, pelas sugestões, auxílios e excelente relacionamento.

A todos os funcionários da Escola de Veterinária com quem pude conviver durante esse período e que colaboraram de forma direta ou indireta para a execução deste trabalho. Especialmente

ao Eduardo Nunes Nogueira, a Nádia Maria da Silva, a Luciene Sudário Santos, a Nilda Lucas Laurindo, a Doraci Reis e a Creuza Atanásio.

A todo o pessoal da Sociedade Protetora dos Animais de Belo Horizonte e a Maria do Carmo, pela preocupação em proporcionar conforto aos animais desvalidos, pelo carinho com estes seres abandonados. Demonstram assim um caráter especial, merecem o meu mais profundo respeito.

A todos aqueles que contribuíram na elaboração desta pesquisa, a Flávia Ferreira Pinto, a Gissandra, ao Marcelo Fernandes Camargos, ao Pedro Motta e ao Christian Hirsch, pelas fundamentais orientações e contribuições, responsáveis por clarear caminhos.

A Maura Pereira Braga e Vanilda Lúcia Ferreira pela preciosa e dolorosa ajuda nas coletas deste trabalho.

Aos amigos da Clínica Veterinária Santo Agostinho por toda compreensão e ajuda técnica quando necessário.

Aos amigos que souberam compreender minha ausência e suportar minha ansiedade.

À FAPEMIG, CNPq, CAPES e FEP/MVZ pelo auxílio financeiro.

Para finalizar, a Deus que sempre me concede saúde, forças e determinação para alcançar meus objetivos e aos animais razão de minha escolha profissional.

SUMÁRIO

		Pág.
	RESUMO	11
	SUMMARY	11
1.	INTRODUÇÃO	12
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1	A Imunodeficiência Felina.....	12
2.2	Manifestações Clínicas.....	12
2.3	Alterações nos Exames Complementares.....	13
2.4	Transmissão.....	14
2.5	O Vírus da Imunodeficiência Felina.....	14
2.6	Estrutura do Vírus.....	14
2.7	Epidemiologia.....	17
2.8	Respostas Imunes ao Vírus.....	18
2.9	Diagnóstico.....	18
2.10	Lecemia Viral Felina.....	20
3.	MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1	Amostras Animais.....	21
3.2	Parâmetros Observados.....	21
3.2.1	Avaliação Clínica dos Animais.....	21
3.2.2	Exames Hematológicos.....	21
3.2.3	Exame Molecular.....	22
3.2.4	Detecção de Anticorpos.....	25
3.3	Análise Estatística.....	25
4	RESULTADOS	25
4.1	Caracterização dos Animais Estudados.....	25
4.2	Alterações Clínicas e Laboratoriais nos Animais FIV Positivo pelo ELISA.....	27
4.3	Detecção do DNA Proviral em Amostras Sanguíneas de Gatos.....	29
4.4	Determinação da Sensibilidade da PCR.....	31
4.5	Determinação de Especificidade da PCR.....	31
4.6	Detecção de Antígenos do Vírus da Leucemia Felina e Anticorpos do Vírus da Imunodeficiência Felina no Soro das 40 Amostras Sanguíneas Testadas pelo ELISA.....	31
4.7	Comparação entre PCR e ELISA na Identificação de Animais Infectados pelo FIV.....	32
4.8	Associações com o FIV.....	32
5.	DISCUSSÃO	33
6.	CONCLUSÕES	37
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Revisão sobre os Estudos Epidemiológicos de FIV no Brasil.....	17
Tabela 2.	Seqüência dos Oligonucleotídeos Utilizados na Amplificação de Um Fragmento de 244 pb do Gene <i>gag</i> e sua Localização no Genoma.....	22

Tabela 3.	Alterações Clínicas e Laboratoriais dos Gatos Positivos para o FIV pelo ELISA	29
Tabela 4.	Freqüência do Vírus da Imunodeficiência Felina pela PCR em Gatos Capturados na Rua e Mantidos em Abrigos em Belo Horizonte.....	30
Tabela 5.	Freqüência de Anti-FIV e Antígenos do FeLV pelo ELISA em Gatos Capturados na Rua e Mantidos em Abrigos em Belo Horizonte.....	32
Tabela 6.	Comparação entre PCR e ELISA na Detecção do FIV em 40 Amostras da População Estudada	32
Tabela 7.	Média dos Valores Hematológicos das 40 amostras FIV positivo, FIV Negativo e Valor de P Encontrado para cada Parâmetro Avaliado	33

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Diagrama da Estrutura do Vírus da Imunodeficiência Felina.....	15
Figura 2.	Representação Esquemática do Genoma Proviral do FIV	15
Figura 3.	Representação Esquemática do Genoma do Vírus da Imunodeficiência Felina e do Fragmento do Gene <i>gag</i> Amplificado na Reação de PCR Utilizando os Iniciadores p-24-1 e p-24-2 Descritos por Hohdatsu et al. (1992).	23
Figura 4.	Foto dos Possíveis Resultados Encontrados no SNAP COMBO – Kit de Teste de Antígenos do Vírus da Leucemia / Anticorpos do Vírus da Imunodeficiência Felina – IDEXX.	25
Figura 5.	Alterações Clínicas e Hematológicas da População Estudada	27
Figura 6.	Resultados Obtidos da Amplificação por PCR Analisados em Gel de Agarose 1% em Tampão TAE e Corado pelo Brometo de Etídeo. Canaletas 1, 2, 7 e 11 – Amostras Negativas; Canaletas 3, 4, e 5 – Amostras Positivas; Canaleta 6 – Padrão de Tamanho Molecular Ladder 100 pb; Canaleta 8 – Controle Positivo do Vírus da Imunodeficiência Felina; Canaleta 9 – Controle Negativo para o Vírus em Estudo; Canaleta 10 – Controle de Reagentes. A Posição da Banda de 244 pb é Demonstrada pela Seta.....	30
Figura 7.	Resultados Obtidos da Amplificação por PCR Analisados em Gel de Agarose 1% em Tampão TAE e Corado pelo Brometo de Etídeo. Determinação do Limite de Detecção da PCR. Canaletas 1 – Amostra 41, 187,5 ng; Canaleta 2 – Amostra 41, 375 ng; Canaletas 3 – Amostras 41, 750 ng; Canaleta 4 – Amostra 41, 1500 ng; Canaleta 5 – Amostras 41, 3000 ng; Canaleta 6 – Padrão de Tamanho Molecular Ladder 100 pb; Canaleta 8 – Controle Positivo do Vírus da Imunodeficiência Felina; Canaleta 9 – Controle Negativo para o Vírus em Estudo; Canaleta 10 – Controle de Reagentes; Canaleta 11 – Amostra 41, 6000 ng/µl. A Posição da Banda de 244 pb é Demonstrada pela Seta	31

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1.	Resultado do BlastN da Amostra 38	43
Anexo 2.	Resultado do BlastN da Amostra 41	45

RESUMO

O vírus da imunodeficiência felina (FIV) é um lentivírus causador de imunodeficiência em felinos domésticos. A infecção é caracterizada por um progressivo declínio de células T CD4+ circulantes, propiciando desta maneira o surgimento de infecções oportunistas. O presente trabalho, estudando uma população de gatos capturados na rua de Belo Horizonte e mantidos em cativeiros, compreendeu um levantamento da ocorrência de gatos positivos para infecções pelos vírus da leucemia felina (FeLV) e da imunodeficiência felina (FIV), a relação entre as alterações hematológicas e clínicas com os gatos soropositivos e a comparação de duas técnicas de diagnósticos (ELISA e PCR) para o FIV. Amostras de sangue periférico de 145 gatos foram testadas pela reação em cadeia da polimerase (PCR), empregando-se os iniciadores P-24-1 e P-24-2 que promovem a amplificação e detecção de parte do gene *gag* proviral em amostras de células mononucleares do sangue periférico. Quarenta amostras das 145 também foram testadas por um kit comercial de ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA - SNAP® Combo FeLV/FIV). Os resultados mostraram que a ocorrência do FIV nesta população é de 4,14% pela PCR e que a do FeLV é de 32,5% pelo ELISA além de relatarem que apenas a emaciação, nas alterações clínicas, apresenta associação positiva com o FIV. Mostraram, ainda, que ambas as técnicas estudadas apresentam alinhamento elevados, demonstrando serem úteis para uma triagem do FIV.

Palavras-chave: Vírus da Imunodeficiência Felina (FIV); Vírus da Leucemia Felina (FeLV); Reação da cadeia da polimerase (PCR).

SUMMARY

The feline immunodeficiency virus (FIV) is a lentivirus that causes immunodeficiency in domestic cats. The disease is characterized by a progressive decline of the number of circulating CD4+ T cells, leaving the animals susceptible to opportunistic infections. In this work, we determined the occurrence of the FeLV and FIV infection in a colony of free-roaming cats caged on the streets of Belo Horizonte – Minas Gerais – Brazil – and kept in confinement and its relationship with hematological abnormalities and clinical alterations. Additionally we compared two methods of detection of the disease (ELISA and PCR). One hundred forty five samples of peripheral blood mononuclear cells were amplified by PCR with synthetic primers, P-24-1 and P-24-2 corresponding to the fragment of *gag* proviral gene. Forty out of the 145 samples collected were also tested in a commercial kit (ELISA – SNAP® Combo FeLV/FIV). The results have showed that the occurrence of FIV in the studied colony was 4.14%, by PCR and the FeLV was 32.5%, by ELISA. Additionally our research pointed that only the weight loss in the clinical abnormalities parameters observations presented statistic positive relationship with FIV infectivity. We also found out that both methods present similar sensitivity and specificity.

Keywords: Feline immunodeficiency virus (FIV); Feline leukaemia virus; Polymerase chain reaction (PCR).

1 INTRODUÇÃO

A imunodeficiência felina a vírus é causada por um lentivírus da família Retroviridae que pode estabelecer infecção persistente em gatos domésticos (*Felis catus*). Vários estudos demonstram que este lentivírus felino está disseminado mundialmente apresentando prevalência variada segundo as regiões geográficas e o estilo de vida do felino. O FIV é hoje um problema de saúde em gatos domésticos em todo o mundo.

Desde sua primeira descrição, em 1987, o FIV foi reconhecido como modelo excelente e estratégico para estudos do vírus da imunodeficiência humana (HIV) e da síndrome da imunodeficiência humana adquirida (AIDS), resultante da infecção com o vírus da imunodeficiência humana do tipo 1 - HIV-1 -. O FIV causa em gatos domésticos uma enfermidade bastante similar àquela observada em pacientes com AIDS humana.

As mais altas taxas de infecção encontram-se em gatos adultos com livre acesso às ruas, os quais freqüentemente apresentam comportamento agressivo.

O diagnóstico da FIV deve ser estabelecido a partir do exame clínico complementado com procedimentos laboratoriais. Trabalhos recentes têm demonstrado discrepâncias quanto aos métodos atualmente utilizados para detecção da infecção por FIV. O ensaio de imunoadsorção enzimático - ELISA - é o mais usado e disponível comercialmente. Embora forneça apenas dados indiretos, este teste tem se revelado suficiente na prática veterinária para diagnóstico da infecção.

O vírus da leucemia felina (FeLV) é também outro retrovírus de grande importância para os felinos domésticos. O FeLV é um significativo patógeno dos gatos que causa uma variedade de desordens neoplásicas e degenerativas e apresentam distribuição mundial.

Os estudos sobre o FIV e FeLV no Brasil são recentes e em número crescente. Têm em comum relatos de ocorrência do vírus em São Paulo, no Rio de Janeiro, no Rio Grande do Sul e em Minas Gerais.

Este trabalho apresenta três objetivos: determinar a freqüência da imunodeficiência felina e da leucemia felina em animais capturados na rua do município de Belo Horizonte; observar aspectos clínicos e hematológicos dos gatos naturalmente infectados com o vírus da imunodeficiência felina e da leucemia felina e comparar dois métodos de diagnóstico da imunodeficiência felina (ELISA e PCR).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A Imunodeficiência Felina

Niels Pedersen e colaboradores descreveram em 1987, pela primeira vez, a doença de um gato doméstico que apresentava sintomas que levaram o dono a acreditar que o animal adquirira algum tipo de AIDS. Investigações posteriores mostraram ser o FIV um problema de saúde em gatos domésticos por todo o mundo. Sua existência fora insuspeita anteriormente porque, como na infecção por HIV, o vírus provoca a ruptura progressiva das funções imunes do portador provocando as manifestações clínicas variadas que se desenvolvem vagarosamente e são impossíveis de se atribuí-la a uma única etiologia na ausência de testes específicos para diagnósticos (Bendinelli et al., 1995).

2.2 Manifestações Clínicas

As numerosas e variadas manifestações clínicas observadas em gatos infectados pelo FIV podem ser conseqüências diretas da infecção e/ou secundária ao estado de imunodeficiência causado pelo vírus (Bendinelli et al., 1995) e podem ser ocasionais, mas tendem a ser progressivamente persistentes. Ishida e Tomoda (1990), propõem 5 fases da doença para os gatos infectados com o FIV:

FASE AGUDA – As infecções primárias são clinicamente silenciosas em alguns casos. Manifestam-se como doenças passageiras com linfadenopatias generalizadas, febre branda, depressão, anorexia e neutropenia que favorecem o aparecimento de infecções bacterianas secundárias. Diarréia aguda, conjuntivites, dermatites, gengivite e sintomas respiratórios suaves estão também presentes nos animais infectados. Poucas mortes são observadas sem clara ligação ao FIV. Estas primeiras manifestações normalmente apresentam boa resposta ao tratamento com antibióticos, provavelmente por ser tratar de infecções secundárias. Na prática veterinária, frequentemente a etiologia não é estabelecida.

FASE ASSINTOMÁTICA – Após os sinais primários de invasão, a infecção permanece inaparente por períodos prolongados. Isto não significa latência, pois o vírus neste período pode ser isolado das células mononucleares do sangue periférico (PBMC), do plasma e da saliva com a mesma frequência que em gatos na fase aguda ou na fase FAIDS. A evolução da infecção é lenta, mesmo após a fase aguda, poucos gatos entram na fase sintomática sem passar pela assintomática. A extensão do período de incubação não parece ter relação com o prognóstico do paciente.

LINFOADENOPATIA PERSISTENTE GENERALIZADA – Fase caracterizada pelo aumento de nódulos linfáticos e vagos sinais clínicos, como febre recorrente, anorexia e perda de peso, mas sem infecções graves.

ARC – O acrônimo vem de *AIDS related complex* introduzido em medicina humana e útil para os estudos de gatos infectados pelo FIV. Gatos nesta categoria apresentam infecções secundárias da cavidade oral e trato respiratório superior. Perdas de peso, linfadenopatias, febre sem origem e anomalias hematológicas são comuns. Alopecia e prurido também podem ser observados. Desordens neurológicas, renais e neoplasias ocorrem menos frequentemente. A maioria dos animais em ARC progride para a fase de FAIDS.

FAIDS – A última fase descrita apresenta semelhança com a AIDS em humanos, a saber: infecções secundárias, tumores como linfossarcomas, fibrossarcomas, doenças mieloproliferativas, tumores de células mamárias, carcinomas e adenomas, oligodendroglioma, meningioma e anormalidades neurológicas como mudança de comportamento, ataxia, convulsões, demência e alterações motoras. O quadro clínico piora rapidamente e o período de vida provável nesta fase é de menos de um ano.

2.3 Alterações nos Exames Complementares

Anormalidades hematológicas são comumente observadas nos animais com infecções naturais. Alterações no leucograma já foram bem relatadas por diversos autores. Na fase primária uma leucopenia transitória, devido a uma absoluta neutropenia, é freqüente. Leucopenia como linfopenia, neutropenia ou trombocitopenia ocorrem em grande proporção em gatos nas fases ARC e FAIDS (Shelton e Linenberger, 1995).

Hofmann-Lehmann et al. (1997) estudando animais infectados experimentalmente, não observaram alterações significativas nas contagens de glóbulos brancos e de células sanguíneas diferenciais nos animais positivos. Em estudos anteriores, a infecção pelo FIV, sob condições de campo, foi associada a várias anormalidades hematológicas, como leucopenia, linfopenia e neutropenia (Sparkes et al., 1993). Hofmann-Lehmann et al. (1997), explicam a discrepância desses resultados por razões relativas ao bem estar dos animais, estilo de vida dos animais, a menor virulência da cepa utilizada e ao estado de saúde dos animais utilizados nos estudos de campo. Os autores, ainda neste estudo, relatam que pequenas alterações foram encontradas na série vermelha dos animais infectados. Animais FIV-positivos apresentaram valores ligeiramente diminuídos de hematócrito e de eritrócitos, após 30 meses da infecção. Esta observação foi acompanhada por um aumento transitório de HCM (hemoglobina

corpúscular média). Os valores mais baixos de contagens de eritrócitos e do hematócrito foram justificados por uma menor capacidade de regeneração de eritrócitos nos gatos infectados pelo FIV do que nos animais não-infectados. Isso, por sua vez, também pode ser explicado por diminuições nas freqüências de progenitores eritróides na medula óssea, já relatadas anteriormente em alguns gatos FIV-positivos (Shelton et al., 1990).

Hofmann-Lehmann et al. (1997), estudando infecções experimentais, afirmaram que os parâmetros importantes de progressão da doença, nas infecções pelo FIV, são os referentes a glicose, proteína, gamaglobulinas, uréia, colesterol e contagens de CD4+. É interessante relatar que os autores enfatizam que as diferenças de parâmetros bioquímicos entre os gatos FIV-positivos e FIV-negativos encontradas no trabalho tenham sido significativas, porém a maioria dos valores ainda se mantinha dentro dos valores de referência.

2.4 Transmissão

A mordida é a principal forma de transmissão do vírus da imunodeficiência felina. A mais alta ocorrência de infecção tem sido invariavelmente encontrada em animais que apresentam comportamento agressivo e em gatos domésticos adultos com livre acesso às ruas. Também as variações geográficas e de gênero relatadas sublinham a importância desta rota de transmissão, uma vez que gatos machos possuem maior propensão para morder que fêmeas e maiores ocorrências são encontradas em partes do mundo onde os gatos são deixados livres com acesso às ruas (Bandecci et al., 1992; Ishida et al., 1989). Natoli et al. (2005), estudando o comportamento dos gatos domésticos que vivem na rua, relataram como o temperamento desses influencia na vulnerabilidade para a imunodeficiência felina.

Hartmann et al. (1998) afirmaram que a principal forma de transmissão natural do vírus é a mordida, embora ela possa ocorrer

pelo útero, colostro e leite. Allison e Hoover comprovaram no ano de 2003 que o vírus está concentrado no leite, no início da lactação de gatas infectadas. No mesmo ano, os autores relataram a importância da transmissão vertical na imunodeficiência felina.

Jordan et al. (1998), demonstraram que o FIV pode ser isolado do sêmem de gatos experimentalmente e naturalmente infectados. Relataram ainda que a inseminação, realizada com sêmem fresco de gatos infectados com o FIV, provoca infecção em fêmeas desta espécie.

2.5 O Vírus da Imunodeficiência Felina

O FIV é um membro do gênero lentivírus e, desta forma, apresenta características estruturais, morfológicas, bioquímicas e genéticas semelhantes a de outros lentivírus como o vírus da imunodeficiência humana do tipo 1 – HIV-1 - (Bendinelli et al., 1995).

O Vírus da Imunodeficiência Felina atualmente é classificado em cinco subtipos: A, B, C, D e E. Esta classificação se baseia na diversidade maior que 20% na seqüência de aminoácidos da região V3 a V5 do gene do envelope (Kakinuma et al., 1995). Tal classificação retrata o estágio atual dos estudos, haja vista o trabalho de Reggeti e Bienzle (2004), que constata intersubtipos recombinantes, no Canadá, e o de Kyaw-Tanner et al. que, dez anos antes, já observavam tipos híbridos. Aliás, o fenômeno das quasiespecies virais, estudado no vírus da imunodeficiência humana por Brown et al. (1994), já foi relatado no vírus da imunodeficiência felina no trabalho de Kyaw-Tanner e Robinson (1996).

2.6 Estrutura do Vírus

O vírion extracelular é esférico a helicoidal, medindo de 100 a 125 nm de diâmetro e limitado por um envelope externo com pequenas projeções pouco definidas. Sua aparência microscópica não parece distinta de outros lentivírus (Pedersen, 1987).

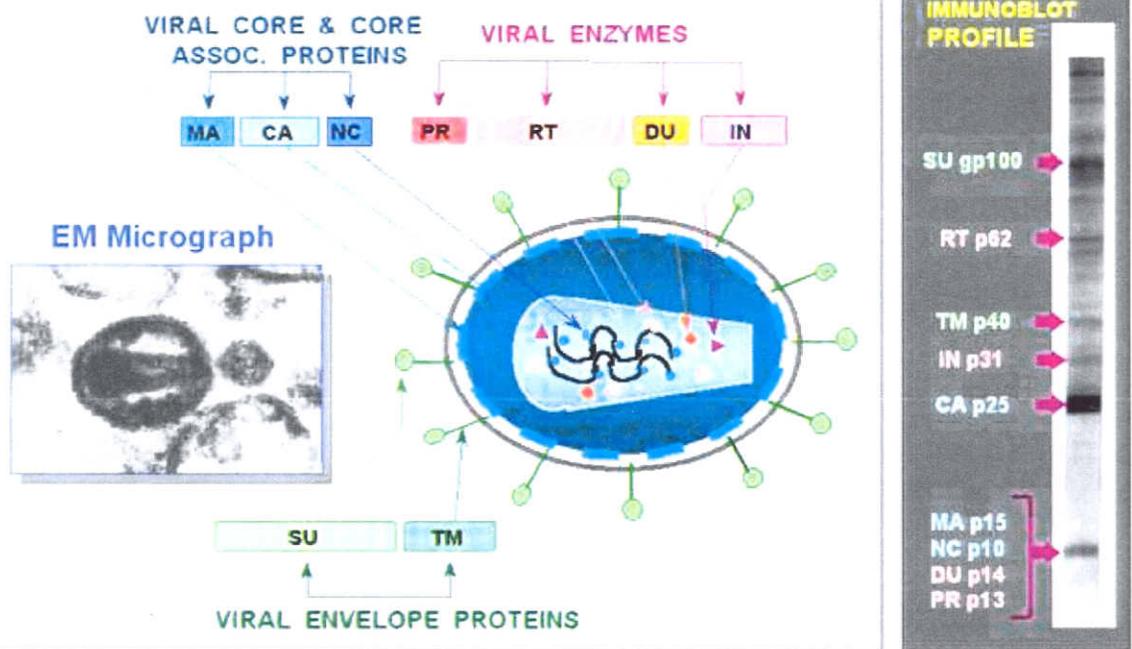


Figura 1: Diagrama da estrutura do vírus da imunodeficiência felina.
 Fonte: www.vetmed.ufl.edu/.../diagnostics.htm

A análise do genoma revela diferenças do vírus em questão com outros lentivirus, embora sua seqüência de organização tenha similaridade (Olmsted et al., 1989).

codificam respectivamente as proteínas estruturais internas, a transcriptase reversa e outras enzimas virais e as proteínas do envelope – além de vários genes acessórios (Olmsted et al., 1989).

O genoma viral se compõe de três grandes regiões genômicas, *gag*, *pol* e *env* que

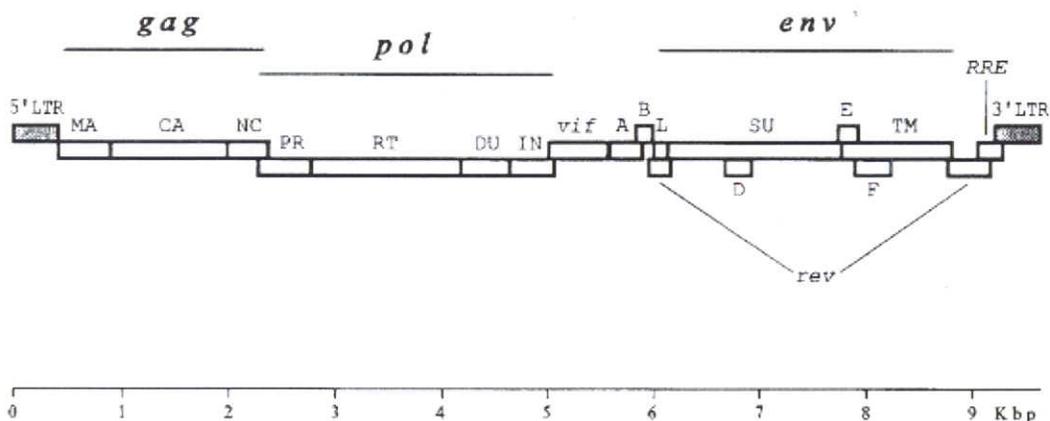


Figura 2: Representação esquemática do genoma proviral do FIV.
 Fonte: Bendinelli et al. (1995).

2.7 Epidemiologia

Infecção pelo FIV tem sido relatada em gatos domésticos de varias partes do mundo. Entre gatos domésticos aparentemente saudáveis, a taxa mais baixa de soropositivos (1% ou menos) foi observada em países europeus e nos EUA. A mais alta foi observada no Japão, 44% (Ishida et al., 1989). Kanzaki e Looney (2004), em uma recente revisão sobre a doença, relatam que 11,04% da população de gatos atualmente na América do Norte, Ásia, Europa e Oceania, apresentam sorologia positiva para o FIV, desconsiderando os

falsos negativos. Os cinco subtipos do vírus apresentam distribuições diferentes pelo mundo, conforme relato de Caxito (2003). O subtipo A é relatado nos EUA, Austrália e Europa; o subtipo B é encontrado no Japão, Europa, EUA, Argentina, Portugal e Brasil; o subtipo C é constatado no Canadá, na Europa e em Taiwan. Já os subtipos D e E são verificados no Japão e na Argentina.

No Brasil estudos sobre a frequência da infecção varia de 2,66% a 37,5%. Abaixo segue uma síntese dos estudos sobre FIV no Brasil relatados por Caxito e Resende (2004) -Tabela 1.

Tabela 1 – Revisão sobre os estudos epidemiológicos de FIV no Brasil

Autores	Ano	Estado	Teste de diagnóstico	Espécie de Felino	Nº de animais testados	% de positivos
Hagiwara et al.	1993	SP	ELISA	<i>Felis catus</i>	401	11,7
Caldas et al.	2000	RS	PCR	<i>Felis catus</i>	40	37,5
Souza et al.	2002	RJ	ELISA	<i>Felis catus</i>	126	16,66
Taniwaki et al.	2002	SP	PCR	<i>Felis catus</i>	500	13,4
Filoni et al.	2003	SP	ELISA	<i>Leopardus pardalis</i> , <i>L. tigrinus</i> , <i>L. wiedii</i> , <i>Herpailurus</i> <i>yaguarondi</i> , <i>Oncifelis geoffroyi</i>	104	0
Caxito et al.	2003	MG	PCR	<i>Felis catus</i>	450	2,66

Fonte: Caxito e Resende (2004)

Gênero e idade também afetam marcadamente a ocorrência de FIV. Vários trabalhos registram maior prevalência em gatos machos (Arjona et al., 2000; Hosie et al., 1989). A infecção é adquirida mais comumente após o primeiro ano de idade e sua prevalência é maior em gatos velhos que novos (Hosie et al., 1989). Outra variável importante na epidemiologia viral, já bem discutida na literatura, é o estado de saúde do animal, pois a ocorrência do FIV se apresenta mais alta em gatos doentes que em saudáveis (Bandecchi et al., 1992;

Hosie et al., 1989; Ishida et al., 1989). Não podemos nos esquecer que a imunodeficiência provocada pelo vírus deixa os animais com maior probabilidade de adquirir infecções oportunistas. Vários autores discutem que as variações na distribuição do FIV são, principalmente, resultado de diferenças no comportamento social e estilo de vida. (Caxito e Resende, 2004).

2.8 Resposta Imune ao Vírus

Gatos infectados pelo FIV desenvolvem uma forte resposta imune humoral direcionada contra determinantes antigênicos nas proteínas virais codificadas pelas regiões genômicas *gag* e *env* (Hosie e Jarrett, 1990, Egberink et al., 1990, Pancino et al., 1993, Lombardi et al., 1993). Gatos infectados experimentalmente com o FIV mostraram soroconversão dentro de 3 a 5 semanas após o desafio e apresentaram uma resposta imune humoral direcionada contra proteínas codificadas pelo *env*, seguida por uma resposta contra proteínas codificadas pelo *gag* (Avrameas et al., 1993).

O FIV usualmente torna-se detectável em 2 a 6 semanas. Anticorpos dirigidos às proteínas centrais principais e a glicoproteína do envelope desenvolvem ao mesmo tempo e tendem a permanecer em altos títulos por toda a vida do animal. Anticorpos adquiridos verticalmente por filhotes declinam em 2 a 3 meses após o parto, a menos que o filhote se torne infectado. Anticorpos neutralizantes são semelhantes em gatos infectados, com ou sem sintomatologia. A exposição ao anticorpo anti-FIV teve pequeno efeito na capacidade de infecção do FIV. *In vitro*, estes anticorpos contribuem para o limite de contágio de célula a célula, especialmente em tecidos não linfóides (Avrameas et al., 1992; Fontenot et al., 1992; Callanan et al., 1991).

2.9 Diagnóstico

Os métodos atualmente utilizados para detecção da infecção por FIV em gatos incluem o isolamento do vírus, testes imunológicos para anticorpos ou antígenos e testes moleculares para detecção de seqüências genômicas do FIV. Em contraste com a maioria de outros vírus, devido a persistência dos lentivírus, uma demonstração indubitável de anticorpos antivirais em soro pode ser considerada uma evidência suficiente para atestar a infecção. A maioria dos testes disponíveis para diagnosticar o FIV detecta anticorpos

específicos no soro, plasma ou até mesmo no sangue total. O teste de imunoadsorção enzimático (ELISA), que proporciona a identificação de anticorpos (anti-FIV), é o único teste comercial disponível e realizado nos laboratórios das Américas do Norte e do Sul. Os testes estão dispostos em formato de kit para uso (SNAP FeLV Ag/FIV Ab – IDEXX), ou em formato *microwell* para ser usado em laboratórios (PetChek kit FIV Ab - IDEXX).

Testes sorológicos para FIV são rápidos e sensíveis. A especificidade e sensibilidade de tais testes são bastante satisfatórias, mas há relatos de resultados falso-positivo e falso-negativo (Hosie e Jarret, 1990). Vírus da imunodeficiência felina isolado em culturas de células mononucleares de sangue periférico de gatos errantes com sorologia negativa tem sido relatado (Sparkes et al., 1993). Yamamoto et al. (1988), demonstram que a soroconversão pode ocorrer após um período de até 14 meses pós-infecção. Dandekar et al. (1992), relatam a presença freqüente do genoma do FIV em gatos soronegativos mantidos por períodos prolongados com gatos infectados com FIV e soropositivos.

Teste de imunofluorescência indireta (IFI) tem sido amplamente utilizado para diagnóstico de diversas doenças infecciosas, incluindo HIV, e tem demonstrado ter sensibilidade semelhante ou igual ao Western blot (imunoblot) para detecção de anticorpos contra o vírus da imunodeficiência humana (Carlson et al., 1987). Richard et al. (1992), relatam que IFI apresentou em seu trabalho sensibilidade de 97,4% e especificidade de 100%. Já Hosie e Jarret, 1990, afirmam que estes testes são menos específicos e podem ser feitos com meros propósitos de demonstração. O teste de Imunofluorescência Indireta não é comumente usado no diagnóstico da infecção pelo FIV e pouco se sabe de sua eficiência.

Outros testes sorológicos disponíveis incluem o Western Blot (WB), o teste de Imunofluorescência Indireta – IFI – e testes de aglutinação (Barr et al., 1991; Wilson et

al. 1994). Testes WB detectam anticorpos contra proteínas virais individuais e são também importantes para estudos relativos à patogenia do FIV (Hosie and Jarret, 1990). Todavia este teste demanda alta tecnologia e alto custo. Todos os soros de gatos naturalmente infectados pelo FIV, em um trabalho de Egberink et al. (1992), reconheceram as proteínas do *env* e uma ou mais proteínas do *gag* além das proteínas do CA (capsídeo), mas nenhuma amostra reconheceu somente as proteínas do *env*. A interpretação dos resultados de WB são bastante discutíveis. O'Connor (1988), menciona que reconhece o animal positivo quando este apresenta reatividade a duas proteínas do *core*; já Hosie e Jarret (1990), defendem a detecção de anticorpos a pelo menos três proteínas do *core* além de reatividade contra as glicoproteínas SU (superfície) do gene *env*. Tais testes mencionados se aplicam também à saliva (Poli et al., 1992). O *microwell* ELISA, usado em laboratórios de veterinária, tem sido descrito como possuindo um alto grau de sensibilidade e especificidade (Barr et al., 1991). Resultados falsos negativos são raros e são frequentemente atribuídos a infecções agudas. Os resultados falsos positivos têm sido atribuídos à deficiência da técnica e reatividade não específica a componentes da cultura de tecidos utilizados na fabricação de vacinas (Barr, 1996). Barr ainda neste trabalho relata que mais de 20% das amostras positivas, no kit ELISA, submetidas à confirmação do Western blot, foram identificados como falsos positivos. Baseado nesses dados, o autor recomenda que o animal saudável positivo no ELISA deva ter o exame confirmado no Western Blot.

Recentemente, os laboratórios na América do Norte têm oferecido testes diagnósticos para veterinários tanto individuais quanto como uma combinação de testes para doenças infecciosas em animais (Teste de DNA e Teste Genético) baseados na detecção do ácido nucléico através da reação em cadeia pela polymerase – PCR. Na verdade, a PCR é um instrumento chave para pesquisa na ciência moderna e frequentemente usada para detectar, quantificar e acessar às variações

genômicas de agentes infecciosos (Belak e Thoren, 2001). O diagnóstico por PCR, de uma infecção, depende de alguns fatores citados no trabalho de Elnifro et al. (2000):

- organismo deve possuir uma região de gene de tamanho suficiente e conservada que permita sua amplificação;
- amostra adequada que garanta a possível presença do organismo;
- quantidade de amostras disponíveis adequadas para testes de rotina;
- grande controle de contaminação do laboratório;
- controles adequados para verificar a qualidade das amostras, e
- ausência de artefatos e ou contaminações de ácido nucléico que não são de interesse.

Deacon e Lah (1989), afirma que a PCR tem permitido a detecção de fragmentos genômicos de muitos agentes infecciosos em amostras clínicas, sendo um método sensível para o diagnóstico de doenças infecciosas.

A PCR é uma técnica usada para amplificação *in vitro* de fragmentos de genomas selecionados, resultando na amplificação dessas seqüências em poucas horas (BelaK e Ballagi-Pordani, 1993). A técnica é baseada na repetição cíclica e automática de três simples reações: desnaturação térmica da fita dupla do DNA; anelamento de iniciadores nas fitas desnaturadas e síntese da fitacomplementar na seqüência molde de DNA. Este fenômeno ocorre através da extensão de cada iniciador anelado, pela ação de enzimas. Teoricamente, após 25 ciclos, a fita inicial de DNA terá sido amplificada na ordem de 10^6 vezes (Deacon e Leah, 1989).

A PCR já vem sendo utilizada para a detecção do FIV em gatos domésticos com bastante eficácia (Caxito, 2003).

Já outros autores afirmam que o FIV é um organismo difícil de detectar com segurança

pela PCR, uma vez que a seqüência de genes difere na proporção de 20% entre isolados do campo (Bachmann et al., 1997), e a quantidade de vírus no sangue é pequena durante a fase assintomática da doença quando grande parte dos exames é realizada (Pedersen et al., 1989).

Recentemente, uma vacina contra a imunodeficiência felina completamente inativada, que induz a uma forte resposta humoral, foi licenciada nos Estados Unidos. Por induzir à formação de anticorpos, indistinguíveis dos anticorpos eliciados pela infecção natural os métodos sorológicos não serão capazes de promover a distinção entre animais vacinados e animais infectados (Uhl et al., 2002). O PCR ou isolamento do vírus, portanto, se torna necessário a despeito das limitações mencionadas. O isolamento de vírus se trata de tecnologia de custo elevado além de demandar várias semanas de trabalho. Já existem métodos de diagnóstico por PCR para o FIV disponíveis comercialmente, em alguns países da Europa e os custos são comparáveis aos dos métodos baseados em ELISA. Ainda é cedo para uma avaliação definitiva do desempenho (Bienzle et al., 2004).

2.10 A Leucemia Viral Felina

O vírus da leucemia felina (FeLV) foi o primeiro retrovírus descoberto nos gatos domésticos por William Jarrett, Escócia ano de 1964 (Jarret, 1999). O FeLV está associada a uma variedade de doenças proliferativas e degenerativas, como leucemias, linfomas e mielodisplasias (Coelho, 2003). Este vírus apresenta quatro subgrupos: A, B, C e o T. Estes subgrupos são distinguidos pela seqüência de nucleotídeo do gene *env* e parecem regular quando e que tipo de doença ocorrerá (Norsworthy, 1993). O FeLV geralmente é transmitido por contato oronasal. Desta forma a transmissão horizontal é a mais importante. Esta ocorre através do contato íntimo de gatos suscetíveis com gatos infectados, que eliminam o FeLV através da saliva, urina e fezes (Rojko e Hardy, 1994). A patogenia da infecção pelo vírus é dependente da dinâmica entre fatores virais

e relacionados ao hospedeiro como, por exemplo, a quantidade de vírus inoculada, o subgrupo do vírus envolvido, a idade do animal acometido, doenças concomitantes, a imunidade do animal e as condições ambientais. A maioria das vezes, o diagnóstico da infecção baseia-se no histórico clínico e na detecção dos antígenos, proteína do núcleo do FeLV (p27), nos leucócitos, plasma, soro ou saliva dos animais suspeitos (Barr, 1998). O ensaio da imunofluorescência indireta (IFA) e o ensaio imunoenzimático são os métodos de diagnósticos mais utilizados para a detecção do vírus (Miyazawa, 2002). O IFA tem a capacidade de detectar antígenos estruturais como a p27 e a p55 que estão presentes nos leucócitos infectados sendo assim isto só ocorre após a viremia (Norsworthy, 1993; Herring et al., 2001). O teste ELISA pode identificar baixas concentrações da proteína p27 no soro, plasma e saliva porém o soro e o tipo de amostra mais aconselhável de ser utilizado pois resulta em baixos resultados de falsos positivos e negativos (Lutz e Jarrett, 1987). Felinos que apresentam resultados positivos para o ELISA deverão estar sob infecção transitória ou estão persistentemente infectados. Gatos positivos para o ELISA deverão ser novamente testados para o FeLV pela IFA e ou pelo ELISA novamente (Mehl, 2001). A PCR atualmente vem sendo empregada para a detecção deste vírus. A PCR positiva para o FeLV indica presença do DNA proviral exógeno porém não necessariamente pode ser utilizada como diagnóstico para a viremia entretanto a RT-PCR detecta a presença do RNA viral e informa o desenvolvimento de viremia nos animais infectados (Herring et al., 2001). Ainda não existe um tratamento eficaz contra a infecção provocada pelo FeLV em gatos. Os gatos infectados podem permanecer assintomáticos por muitos anos. Já os gatos sintomáticos têm prognóstico reservado e uma sobrevida curta (Norsworthy, 1993). Estudos epidemiológicos demonstram que o vírus encontra-se disseminado no mundo e que sua prevalência varia de acordo com as diferentes localizações geográficas e com o estilo de vida da população felina (Coelho, 2003). No Reino Unido Hosie et al. (1989),

descreveu que a prevalência pelo ELISA do FeLV foi de 14%. Braley (1994), em um estudo realizado na Europa e nos Estados Unidos observou a maior prevalência deste vírus na França de 19%. Nos Estados Unidos 14,81% dos gatos testados foram positivos para o FeLV. Na Espanha, num estudo realizado em Madrid, foi verificado a prevalência de 16,7% entre os animais saudáveis e de 32,6% entre os animais com algum sinal clínico (Arjona et al., 2000). Outros estudos observaram diferentes prevalências do FeLV como o de Malik (1997), que constatou 2% de felinos positivos em Sydney. No Brasil em um estudo realizado em São Paulo 12,5% dos gatos testados foram positivos para o FeLV já no Rio de Janeiro a frequência do vírus da leucemia felina foi de 20,35% (Souza et al., 2002). Em um único estudo realizado no Estado de Minas Gerais Magalhães-Coelho, no ano de 2004, observou a presença do vírus em 63,36% das amostras analisadas da região metropolitana de Belo Horizonte.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostras Animais

As amostras foram coletadas de 145 animais (*Felis catus domesticus*), sem raça definida, capturados na rua no município de Belo Horizonte (MG) mantidos em abrigos, dos quais 80 animais pertencem à Sociedade Protetora dos Animais (SPA) de Belo Horizonte e os 65 restantes vivem em um abrigo de felinos, no município de Ribeirão das Neves, na região metropolitana de Belo Horizonte.

3.2 Parâmetros Observados

3.2.1 Avaliação Clínica dos Animais

Os animais foram submetidos a um exame clínico metódico. Os animais foram submetidos à inspeção e palpação; tiveram suas frequências respiratórias e cardíacas aferidas e seu peso e temperatura corporais anotados. Após a avaliação e identificação, os dados dos animais foram lançados em uma ficha clínica na qual constava identificação do gato com os atributos raça,

sexo, procedência e bairro de origem bem como dados clínicos.

3.2.2 Exames Hematológicos

Coleta das Amostras

As amostras de sangue foram coletadas dos 145 animais através de venopunção da veia jugular, utilizando seringas descartáveis (Becton & Dickinson - BD) com agulhas 25x7. Em cada procedimento foram coletados aproximadamente 10 ml de sangue. Desse volume, 6 ml foram acondicionados em frasco de vidro contendo 2 gotas de ácido etilenodiaminotetraacético, sal dissódico 10% (EDTA), para realização de hemograma e de coleta de células mononucleares para a extração de DNA e posterior reação em cadeia da polimerase - PCR. O sangue restante foi acondicionado em tubo de ensaio sem anticoagulante e mantido em repouso, inclinado, durante 2 horas, à temperatura ambiente, para promover a retração do coágulo e liberação do soro. Em seguida, o tubo foi centrifugado a 1000 g por 10 minutos, e procedeu-se a separação do soro. O soro de cada animal foi dividido em três alíquotas iguais e congeladas a -20°C , para posterior teste sorológico para detecção de leucemia felina e imunodeficiência felina.

Hemograma Completo

Para execução desses exames, foram utilizadas metodologias adotadas no Laboratório de Patologia Clínica do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária da Escola de Veterinária da UFMG. Avaliou-se a série vermelha, determinando o número de hemácias por μL de sangue, determinação de volume globular (%), conteúdo de hemoglobina (g/dl) e usando essas informações para calcular o volume celular médio (VCM) e a concentração de hemoglobina celular média (CHCM). Também se analisou a série branca, através da contagem global dos leucócitos. Os parâmetros citados acima foram realizados e calculados no aparelho automático de contagem de células desse laboratório (Animal Blood Count -

ABC X-VET®). O exame diferencial dos leucócitos foi realizado através de microscopia, com objetiva de imersão, do esfregaço sanguíneo realizado no momento da coleta do material e posteriormente (em até 24 hs.) corado pelo May-Gruenwald-Giemsa. Os valores obtidos foram comparados com os descritos por JAIN (1986).

3.2.3 Exame Molecular

Extração do DNA

A partir do sangue coletado em EDTA foram obtidas as células mononucleares do sangue periférico das 145 amostras, que foram separadas pelo método Ficoll-Hypaque® (Pharmacia Biotech) de acordo com as recomendações do fabricante. O DNA foi preparado por digestão com proteinase K- Sódio dodecil sulfato (SDS),

seguido por extração com fenol-cloroformio e posterior precipitação com etanol (Hohdatsu et al., 1992). Após extração a concentração de DNA foi estimada por espectrofotometria, a 260 nm de comprimento de onda, e mantido a -20°C até ser utilizado para reação de PCR (Sambrook et al., 1989).

Condições da PCR para Amplificação do Fragmento do Gene gag

Iniciadores

Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificar um fragmento de 244 pares de base do gene *gag*; baseados na seqüência de nucleotídeos do FIV descritos por Talbott et al., 1989 (*Petaluma strain*); foram desenhados por Hohdatsu et al. (1992) e serão descritos na tabela 2.

Tabela 2: Seqüência dos oligonucleotídeos utilizados na amplificação de um fragmento de 244 pb do gene *gag* e sua localização no genoma.

Iniciador ^a	Sequencia (5' → 3')	Região	Localização no genoma ^b	Fragmento amplificado
P-24 - 1 (+)	CTAGGAGGTGAGGAAGTTCA	<i>gag</i> p - 24	1119 - 1138*	244 pb
P-24 - 2 (-)	CTGCTTGTTGTTCTTGAGTT	<i>gag</i> p - 24	1343 - 1362*	

a: (+) Senso; (-) Anti-senso.

b: Os números correspondem àqueles da seqüência do FIV descrita por Talbott et al. (1989).

Amplificação

As reações foram realizadas em um volume total de 20 µl contendo 10mM TrisHCl pH 8,3; 50 mM KCl; 1,5 mM de MgCl₂, 1% de glicerol (p/v); 1% de DMSO (p/v); 10 pmoles de cada iniciador; 0,2 mM de cada deoxinucleotídeo (Promega, USA); 0,5 U de Taq DNA polimerase (Gibco-BRL, EUA) e 2 µl da preparação de DNA contendo 750 ng de DNA felino. Uma fina camada de óleo mineral foi adicionada a cada microtubo. A reação de amplificação foi realizada em um termociclador programável (MJ Research, Inc., USA). Os ciclos padronizados para amplificação do DNA foram realizados

conforme descritos por Hohdatsu et al. (1992): uma incubação inicial a 94°C por 5 minutos, o que era seguido de 35 ciclos, cada um consistindo de desnaturação a 94°C por 60 segundos, hibridização a 55°C por 120 segundos, extensão pela polimerase a 72°C por 120 segundos e extensão final a 72°C por 5 minutos. A representação esquemática do genoma e do fragmento amplificado na reação está demonstrada na figura 3. O resultado de cada PCR foi submetido novamente a outro PCR, aumentando desta forma a sensibilidade do teste conforme descrito pelo mesmo autor citado neste parágrafo.

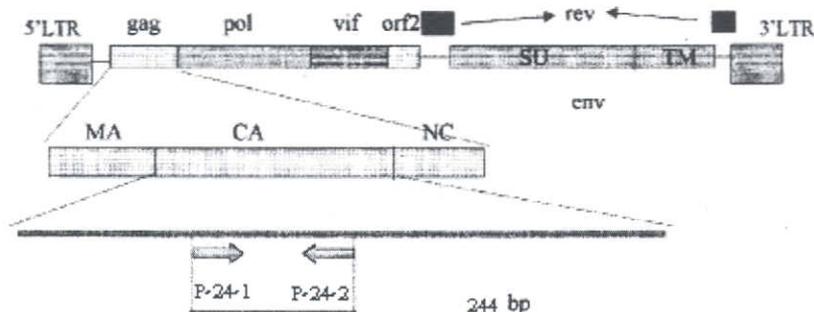


Figura 3: Representação esquemática do fragmento do gene *gag* amplificado na reação de PCR utilizando os iniciadores P-24-1 e P-24-2 descritos por Hohdatsu et al. (1992).

Análise dos produtos de PCR

Eletroforese

Dez microlitros de cada de PCR foram submetidos à eletroforese (100V e 400 m.a. por 40 minutos) em gel de agarose a 1% (p/v) em tampão TAE 1X (20,3 mM KH_2PO_4 , 10,4 mM Tris-acetato, 10 mM EDTA pH 8,0), contendo brometo de etídeo (0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Em cada corrida foi incluído o padrão de tamanho molecular Ladder 100 pb (AMRESCO®, USA) com fragmentos variando de 100 a 3000 pb. Em toda a reação havia um tubo controle de reagentes, que não continha DNA, controle negativo e controle positivo. Os géis foram visualizados e fotografados sob iluminação U.V. (320 nm) utilizando o sistema de fotografia Image Máster VDS (Amersham Pharmacia Biotech, Suécia).

Avaliação da sensibilidade da PCR

O DNA obtido a partir de uma amostra de células mononucleares do sangue periférico, sabidamente positiva para FIV, pela PCR, estimado por espectrofotometria UV (Sambrook et. al., 1989), foi submetido a diluições duplas sucessivas seguidas de PCRs para definição da quantidade mínima

de DNA capaz de ser amplificada no teste utilizado.

Avaliação da especificidade da PCR

Os produtos de PCR obtidos de duas amostras consideradas positivas, foram purificados com Kit Wizard PCR Preps DNA Purification System (Promega, EUA), conforme protocolo do fabricante e submetidas à reação de sequenciamento feita por ciclagem térmica em um seqüenciador automático (ALF – Amersham Pharmacia Biotech, Suécia – do BIOAGRO, Universidade Federal de Viçosa, MG). A seqüência obtida foi editada e avaliada para a remoção de seqüências dos iniciadores, além de possível resolução de algumas ambigüidades. A seqüência editada foi então analisada para a determinação de homologia com seqüências de FIV depositadas no Banco de genomas, GenBank (National Center for Biotechnological Information) – www.ncbi.nlm.nih.gov.

3.2.4 Detecção de Anticorpos para o FIV e Antígenos para o FeLV

ELISA

Da amostra total foram separados os soros de 40 animais, dos quais seis eram de animais positivos para a imunodeficiência felina de acordo com o resultado da PCR. Os 34 restantes foram escolhidos aleatoriamente. Todos os 40 foram submetidos a testes para verificar a

presença de anticorpos anti-FIV, contra a proteína viral p24, e proteína p27 do FeLV através de *kits* comerciais para a técnica ELISA (SNAP Combo – Kit de teste de antígenos do vírus da leucemia/anticorpos do vírus da imunodeficiência felina – IDEXX). Os resultados possíveis estão demonstrados na figura 4. Após os resultados, os animais positivos, para o vírus da imunodeficiência felina, foram classificados utilizando-se o critério sugerido por Ishida e Tomoda (1990).

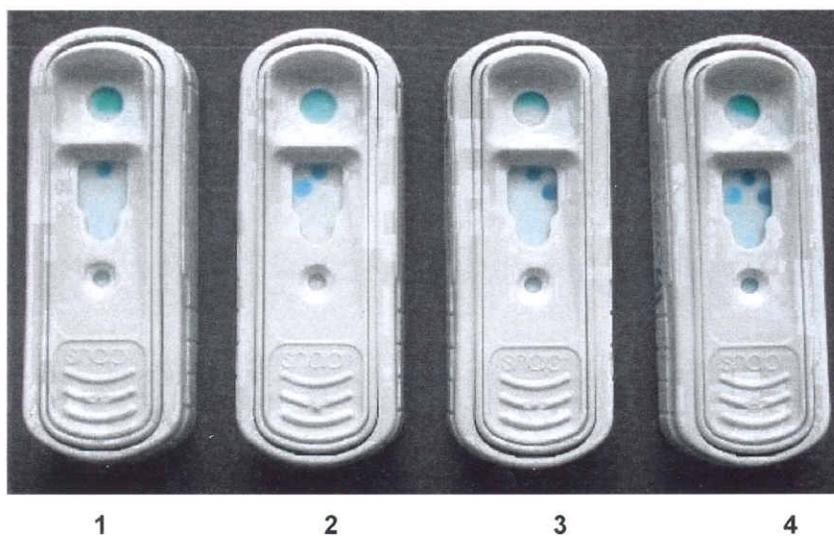


Figura 4: Foto dos possíveis resultados encontrados no SNAP Combo – Kit de teste de antígenos do vírus da leucemia / anticorpos do vírus da imunodeficiência felina – IDEXX. SNAP 1 – Amostra negativa para FIV e FeLV. SNAP 2 – Amostra positiva apenas para o FIV. SNAP 3 – Amostra positiva apenas para o FeLV. SNAP 4 – Amostra positiva para FIV e FeLV.

3.3 Análise Estatística

A análise estatística dos dados quanto ao sexo e às alterações clínicas observadas durante o exame clínico dos animais do estudo foi baseada no teste exato de Fisher. Já as alterações hematológicas da população em estudo foram baseadas em uma análise não paramétrica do Teste de T de Student, utilizando nível de significância de 95%. Para análise de concordância entre os resultados obtidos na PCR e ELISA foi utilizado o teste Kappa.

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização dos Animais Estudados

De 145 animais estudados 82 % apresentavam alterações clínicas ou laboratoriais. Os animais sadios, desta população, estavam sempre em contato com os animais doentes favorecendo, desta forma, a disseminação de várias doenças. Estas alterações estão apresentadas na figura 5.

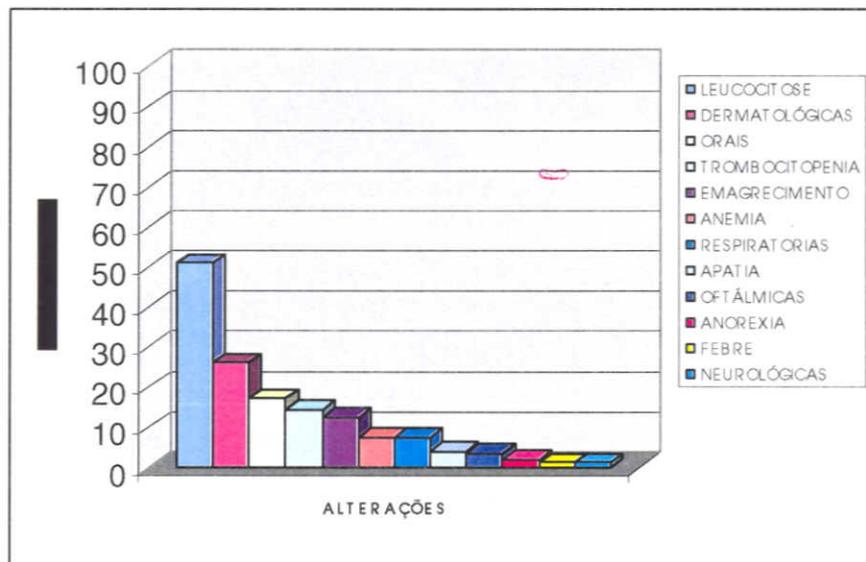


Figura 5 – Alterações clínicas e hematológicas da população estudada.

4.2 Alterações Clínicas e Laboratoriais nos Animais FIV Positivo pelo ELISA

Dos 9 animais com sorologia positiva para FIV somente 2 (22,2%) apresentavam-se assintomáticos. Os outros 7 animais restantes apresentavam várias alterações clínicas. Dois terços dos animais positivos 66,6% (6/9) apresentavam-se no estágio ARC da doença e apenas 1 no estágio AIDS

de acordo com o critério estabelecido por Ishida e Tomoda, 1990. Entre os 9 gatos positivos para o FIV as principais manifestações clínicas observadas foram emaciação com perda de peso, 55,5% (5/9) e leucocitose com neutrofilia, 44,4% (4/9). Os dois animais positivos para FIV e FeLV encontravam-se bastante debilitados com alterações clínicas graves. As alterações clínicas encontradas nos animais soropositivos estão resumidas na tabela 3.

Tabela 3 – Alterações clínicas e laboratoriais dos gatos positivos para o FIV pelo ELISA.

Amostra	Sexo	Estágio	Alterações clínicas e laboratoriais
FeLV-negativo			
38	F	ARC	dermatopatia, alt. Resp., leucoc., neutrof., anisoc.
44	M	ARC	dermatopatia, cistite, leucoc., neutrof., linfocitose, anisoc., desidratação, azotemia, proteinúria
56	F	Assintomático	-
66	F	ARC	emaciação, perda de peso, linfopenia, anisoc.
76	F	Assintomático	-
93	M	ARC	dermatopatia, emaciação, perda de peso, estomatite
125	M	ARC	emaciação, perda de peso, leucoc., neutrof., azotemia
FeLV-positivo			
41	M	AIDS	emaciação, perda de peso, apatia, anorexia, alt. resp., desidratação
117	M	ARC	emaciação, perda de peso, anemia normoc., normoc., leucoc., neutrof.

4.3 Detecção do DNA Proviral em Amostras Sangüíneas de Gatos

Utilizando altas condições de extringência, obteve-se na PCR uma banda de forte intensidade do tamanho esperado de 244 pb em 6 (4,14%) das 145 amostras de sangue analisadas (tabela 4). Apenas duas amostras apresentaram bandas inespecíficas. A sensibilidade do teste não

apresentou alteração quando o resultado de cada PCR era submetido novamente a outro PCR. Alguns dos resultados da PCR estão demonstrados nas figuras 6.

Analisando os resultados obtidos na PCR confrontados com os exames clínicos e laboratoriais, verificou-se que a freqüência do vírus entre os animais doentes foi de 3,36% (4/119) e entre os animais assintomáticos, 7,69% (2/26).

Tabela 4 - Frequência do vírus da imunodeficiência felina pela PCR em gatos capturados na rua e mantidos em abrigos em Belo Horizonte.

Gatos	N ^o de Animais	FIV
♀	88 60,69%	2 1,38%
♂	57 39,31%	4 2,76%
Total	145 100%	6 4,14%

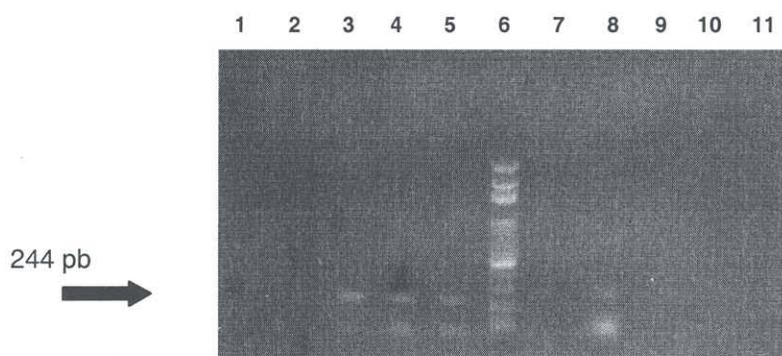


Figura 6: Resultados obtidos da amplificação por PCR analisados em gel de agarose 1% em tampão TAE e corado pelo brometo de etídeo. Canaletas 1, 2, 7 e 11 – amostras negativas; canaletas 3, 4, e 5 – amostras positivas; canaleta 6 – padrão de tamanho molecular Ladder 100 pb; canaleta 8 – controle positivo do vírus da imunodeficiência felina; canaleta 9 – controle negativo para o vírus em estudo; canaleta 10 – controle de reagentes. A posição da banda de 244 pb é demonstrada pela seta.

4.4 Determinação da Sensibilidade da PCR

A concentração de DNA de uma amostra positiva (amostra 41) foi estimada por

espectrofotometria obtendo-se 750 ng/μl. Em seguida, foi diluída e submetida a PCR. A amplificação visível foi de 187,5 ng a 1500 ng de DNA (Figura 7). A reação padrão foi realizada utilizando-se 750 ng de DNA felino.

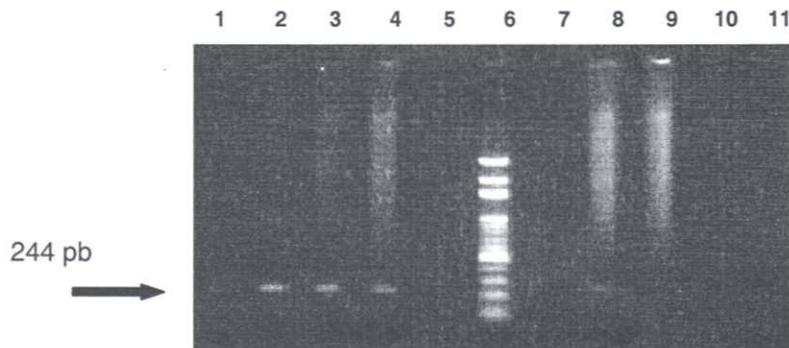


Figura 7: Resultados obtidos da amplificação por PCR analisados em gel de agarose 1% em tampão TAE e corado pelo brometo de etídeo. Determinação do limite de detecção da PCR. Canaletas 1 – amostra 41, 187,5 ng; canaleta 2 – 375 ng; canaleta 3 – 750 ng; canaleta 4 – 1500 ng; canaleta 5 – 3000 ng; canaleta 11 – 6000 ng/μl; canaleta 6 – padrão de tamanho molecular Ladder 100 pb; canaleta 8 – controle positivo do vírus da imunodeficiência felina; canaleta 9 – controle negativo para o vírus em estudo; canaleta 10 – controle de reagentes. A posição da banda de 244 pb é demonstrada pela seta.

4.5 Determinação de Especificidade da PCR

Os resultados obtidos com o sequenciamento das duas amostras (38 e 41) mostraram que os fragmentos amplificados apresentam homologia com outras seqüências do FIV depositadas no GenBank, conforme os anexos 1 e 2. Tais resultados foram obtidos com o uso do programa BlastN (www.ncbi.nlm.nih.gov).

4.6 Detecção de Antígenos do Vírus da Leucemia Felina e Anticorpos do Vírus da Imunodeficiência Felina no Soro das 40 Amostras Sanguíneas Testadas pelo ELISA

Das quarenta amostras analisadas 13 (32,5%) foram positivas para o FeLV, 7 (17,5%) positivas para o FIV e 2 (5%) positivas para ambos os vírus. Esses resultados estão resumidos na tabela 5.

Não foi vista nenhuma predisposição sexual estatisticamente significativa tanto entre os gatos infectados pelo FeLV quanto entre os gatos infectados pelo FIV.

Tabela 5 - Frequência de anti-FIV e antígenos do FeLV pelo ELISA em gatos capturados na rua e mantidos em abrigos em Belo Horizonte.

Gatos	N	FIV	FeLV	FIV / FeLV
♀	27 (67,5%)	4 (10%)	9 (22,5%)	0 (0%)
♂	13 (32,5%)	3 (7,5%)	4 (10%)	2 (5%)
Total	40 (100%)	7 (17,5%)	13 (32,5%)	2 (5%)

4.7 Comparação entre PCR e ELISA na Identificação de Animais Infectados pelo FIV

Das 40 amostras testadas pelos testes PCR e ELISA, 6 (15%) foram positivas pela PCR e ELISA; 3 (7,5%) positivas pelo ELISA e negativas pelo PCR; 31 (77,5%) negativas

para ambos os testes e nenhuma positiva pela PCR e negativa no ELISA. Esses dados estão relatados na tabela 6. Apesar do ELISA ter detectado mais amostras positivas em relação à PCR o valor da estatística Kappa (κ) foi de 0,75 demonstrando alinhamento elevado ou alto nível de concordância entre os testes (Sampaio, 2002).

Tabela 6 – Comparação entre PCR e ELISA na detecção do FIV em 40 amostras da população estudada.

	PCR positivo	PCR negativo	Total
ELISA positivo	6	3	9
ELISA negativo	0	31	31
Total	6	34	40

Kappa: 0,756098(IC 95% 0,456-1)

4.8 Associações com o FIV

A população em estudo apresentava várias alterações clínicas, porém a única alteração clínica com associação significativamente positiva com os animais soropositivos para o FIV foi a emaciação, perda de massa muscular e conseqüentemente de peso corporal (o valor de P de 0,016 no teste exato de Fisher). Nenhuma associação foi vista entre sexo dos animais e o FIV.

Associações significativas entre as alterações hematológicas e os animais positivos para o FIV só aconteceram na distribuição espacial dos eritrócitos (RDW), que avalia a porcentagem de anisocitose. Os demais parâmetros hematológicos não demonstraram associações significativas, conforme a tabela 7.

Tabela 7 - Média dos valores hematológicos das 40 amostras FIV positivo, FIV negativo e valor de P encontrado para cada parâmetro avaliado.

Testes Laboratoriais	Valores normais*	Média dos valores dos animais FIV		Valor de P*
		Positivos	Negativos	
Eritrócito x 10 ⁶ /μL	5,0 – 10,0	7,68	7,57	0,853
Hemoglobina (g/dL)	8,0 – 15,0	11,21	11,0	0,828
Hematócrito (%)	24 – 45	34,16	33,73	0,879
VCM (fL)	37 – 50	44,65	44,65	0,879
CHCM (g/dL)	30 – 36	32,82	32,67	0,774
RDW (%)	17 – 20	17,04	16,14	0,056
Leucócitos x 10 ³ /μL	5,5 – 19,5	26,21	21,12	0,243
Neutrófilos segmt. x 10 ³ /μL	2,5 – 12,5	19,54	15,29	0,217
Linfócitos x 10 ³ /μL	1,4 – 7,0	3,43	3,87	0,657
Monócitos x 10 ³ /μL	0,1 – 0,79	0,159	0,448	0,196
Eosinófilos x 10 ³ /μL	0,1 – 0,79	2,16	0,635	0,176
Plaquetas x 10 ³ /μL	170 - 750	401	316	0,224

• Utilizado teste T Student com nível de significância de 95%.

5 DISCUSSÃO

Número crescente de trabalhos ocorre em todo o mundo demonstrando um aumento considerável dos debates a respeito das doenças transmitidas por animais errantes, nestes últimos anos (Luria et al., 2004, Mendes-de-Almeida et al., 2004). O interesse nesta população aumenta não apenas pela sua importância para a saúde pública, aspecto zoonótico demonstrado por Lucas et al. (1998), e Malik et al. (1992), mas também pelo risco de manutenção e disseminação de doenças para os felinos particulares.

A população estudada apresentou uma singularidade que deve ser sempre

lembrada neste estudo. Os animais não recebiam aporte nutricional ideal; os animais novos, recém-chegados em cada abrigo, não eram submetidos a uma triagem e muito menos eram colocados em um programa de quarentena, além de não sofrerem necessariamente a terapêutica correta quando preciso. As condições financeiras dos abrigos envolvidos no estudo não permitiam maiores gastos que os atualmente empregados. Esta população apresentava-se muito debilitada, pois 82,1% dos animais examinados apresentavam algum tipo de alteração. As alterações documentadas dos animais positivos para o Vírus da Imunodeficiência Felina não podem ser atribuídas necessariamente à infecção pelo retrovírus citado. Uma grande

variedade de fatores, como idade, condições de vida do animal e outras infecções podem contribuir para as alterações observadas e a duração da infecção geralmente é desconhecida.

Neste estudo, uma taxa de 77,7% foi encontrada de animais doentes entre aqueles animais com sorologia positiva para o FIV. Reche Jr. et al. (1997), encontraram resultados semelhantes de 83%. Já Souza et al. (2002), encontraram o valor de 20,2%. Os animais doentes positivos para o FIV apresentavam alterações já bem documentadas na literatura (Pedersen et al., 1989; Hosie et al., 1989).

A reação de PCR utilizada foi capaz de detectar seis (4,14%) felinos portadores do FIV nos 145 examinados. A sensibilidade do teste não apresentou alteração quando o resultado de cada PCR era submetido novamente a outro PCR contrariando assim os resultados de Hohdatsu et al. (1992). Isto pode ser explicado pela padronização da técnica neste trabalho (determinação da sensibilidade).

A detecção do vírus já era esperada, pois Hagiwara et al. (1997), relatam casos de gatos infectados pelo FIV no Brasil e Caxito (2003), constatou a presença do vírus em Belo Horizonte a partir de uma PCR-*nested*. Comparando-se as seqüências de amostras japonesas (número de acesso 37823 e 37824) descritas por Kakinuma et al. (1995), com as seqüências obtidas no presente trabalho, encontramos de 96 a 98% de homologia de nucleotídeos com as amostras 38 e 41, respectivamente.

Neste trabalho utilizamos a PCR, como técnica de diagnóstico, e nossa população, como já bem relatada, apresenta características singulares desta forma estudos comparativos com a literatura torna-se difícil. Este trabalho não apresenta a pretensão de ser um estudo epidemiológico entretanto aqui iremos fazer algumas comparações. Os resultados diferem dos dois únicos trabalhos realizados com gatos com este perfil (gatos errantes) no Brasil: o de Caxito (2003), em Belo Horizonte, que relata ocorrência do FIV de 1,11% entre os

animais que tinham procedência de rua e 3,05% dos animais domiciliares e dos trabalhos de Mendes-de-Almeida et al. (2004), no estado do Rio de Janeiro, que encontraram 21% dos animais positivos para o FIV. Caxito (2003), relata a ocorrência total de 2,66%. Os resultados contrários aos encontrados no Rio de Janeiro poderiam ser explicados pela maior prevalência da doença naquele estado comparada à no estado de Minas Gerais (Caxito, 2003). Confrontando os resultados com o único estudo até então realizado em Belo Horizonte, verificamos que nossa frequência (4,14%) apresenta resultados superiores àqueles encontrados pela autora (2,66%). Lembrando que utilizamos a mesma técnica de diagnóstico para a doença e a mesma região gênica.

O trabalho, mesmo utilizando uma população de felinos mais susceptível a infecções pelo FIV, apresenta resultados de frequência muito inferiores aos encontrados em outros estados do Brasil. Estudos sorológicos apresentaram ocorrência do FIV em 18,24% e 11,95% das populações estudadas no Rio de Janeiro e São Paulo respectivamente (Souza et al., 2002, Reche Jr. et al., 1997). Os estudos realizados no Brasil, citados acima, utilizaram metodologia de diagnóstico diferente da empregada neste trabalho. Isto justifica a comparação de ambas técnicas: a PCR, utilizada nos estudos em Minas Gerais, e a ELISA, utilizada nos estudos no Rio de Janeiro e em São Paulo que segundo Zenger (2000) e Levy et al. (2004) apresenta alta sensibilidade, especificidade e praticidade.

Dos animais testados na PCR, 27,6% (40/145) foram submetidos ao ELISA (SNAP COMBO – KIT DE TESTE– IDEXX) incluindo neles as seis amostras positivas. O ELISA detectou três amostras positivas, além das seis já diagnosticadas pela PCR. Apesar deste resultado, o cálculo do *Kappa* demonstrou ambas técnicas de diagnóstico para o FIV com sensibilidade e especificidade semelhantes, particularmente se tivermos em mente a baixa ocorrência desta doença na população felina, no ambiente onde o estudo foi realizado.

Comparamos dois métodos de diagnóstico para a doença. O ELISA detecta a resposta indireta a infecções do FIV, já a PCR detecta diretamente o genoma do vírus, que se encontra integrado ao genoma felino. Desta forma, é provável que se encontrem resultados divergentes na comparação.

Na literatura encontram-se resultados discrepantes com relação aos métodos de diagnósticos para o FIV. Bienzle et al. (2004), criticam categoricamente o teste de PCR. O autor afirma que pouco se conhece deste teste e advertiu que a validade do teste do PCR para a infecção do FIV não foi ainda confirmada. O autor relata que vários trabalhos, utilizando a técnica de PCR, apresentam resultados variados. Bienzle et al. atribuíram essas alterações a uma baixa sensibilidade da PCR. Relatam ainda as possíveis razões para os falsos negativos: qualidade inadequada das amostras, *primers* empregados inadequados e insuficiência de reagentes - componentes básico para reação.

Resultados divergentes também foram encontrados para outros retrovirus como o BLV. Camargos (2005) relata que animais positivos para o Vírus da Leucose Bovina podem apresentar resultados falsos negativos na PCR não somente pelo estágio de infecção, mas também pelo pequeno número de linfócitos infectados (Murtaugh et al., 1991; Eaves et al., 1994), pelo pequeno número de cópias do provírus nos linfócitos infectados (Molloy et al., 1994), pela infecção restrita a órgãos linfóides (Klintevall et al., 1994) e pela presença de inibidores da Taq DNA polimerase nas amostras de DNA (Rolfs et al., 1992).

Também devemos relatar que os métodos sorológicos, como o ELISA, podem gerar resultados falso-positivos, levando a uma taxa de ocorrência maior que a real (Reche Jr et al., 1997; Souza et al., 2002).

O Vírus da Imunodeficiência Felina e o Vírus da Leucemia Felina são os agentes causadores de doenças mais comuns em gatos domésticos. Ambas as viroses causam imunossupressão além da perda de peso em gatos infectados (Luria et al.,

2004). Ambas viroses apresentam distribuição mundial. No presente estudo a frequência de FeLV e FIV diagnosticada pelo ELISA, foi de 32,5% e 17,5%, respectivamente sendo que 5% dos animais apresentaram ambas viroses. O número de animais positivos para o FIV pelo ELISA é explicado pela forma de seleção das amostras analisadas. A prevalência do FeLV em animais que freqüentam clínicas varia de 2% a 18% (Bandeccchi et al., 1992; Yamamoto et al., 1989). Entre os animais doentes, esta prevalência aumenta. Com relação ao Vírus da Leucemia Felina o valor encontrado é semelhante ao encontrado no Rio de Janeiro por Souza et al. (2002). Já levando em consideração os resultados encontrados em São Paulo, por Reche Jr. et al. (1997), que foi de 8% os resultados foram superiores. Com relação ao único trabalho realizado em Belo Horizonte, no estado de Minas Gerais, o valor está bem inferior. Coleho (2003) relata a ocorrência do DNA proviral do FeLV exógeno em 63,36% da população de gatos domésticos do seu estudo.

A frequência do FIV entre os animais assintomáticos foi de 7,69% já entre os gatos doentes, 3,36%. Esses dados contrariam a literatura que estima a prevalência da infecção do FIV entre gatos domésticos assintomáticos: 6% no Reino Unido (Hosie et al., 1989), 12% no Japão (Ishida et al., 1989) e entre 1 a 14% nos Estados Unidos, dependendo da idade, gênero e risco de exposição (Pedersen et al., 1987, Yamamoto et al., 1989). E entre os animais doentes, a prevalência estimada é entre duas a três vezes maiores (Hosie et al., 1989, Ishida et al., 1989). A diferença relatada entre os animais positivos para o FIV, doentes e sadios, pode ser explicada pela característica da população estudada neste trabalho já descrita no início desta discussão.

Quando os parâmetros hematológicos de todos animais estudados foram submetidos ao teste de T de Student, somente uma diferença significativa foi encontrada entre os animais positivos e os negativos para o vírus. Esta foi detectada na série vermelha (eritron): na distribuição espacial das células

vermelhas (RDW), que verifica a porcentagem de células com anisocitose ($p = 0.056$). Em nosso trabalho os animais negativos para o vírus da imunodeficiência felina apresentaram maior anisocitose do que os animais positivos. Isso contraria os resultados de Shelton et al. (1995) que afirma maior anisocitose nas amostras de felinos positivos para o FIV devido a diminuições nas frequências de progenitores eritróides na medula óssea.

Nenhuma diferença significativa foi encontrada nas contagens de glóbulos brancos totais contrariando assim os dados de Hofmann-Lehmann et al. (1997). De qualquer forma isto já era esperado devido as condições orgânicas dos animais do estudo já relatadas. Os gatos FIV-positivos, FELV-positivos e FIV-FELV-positivos apresentaram uma tendência para contagens altas de glóbulos brancos. Nenhuma outra diferença significativa foi encontrada nas contagens diferenciais absolutas.

Hofmann-Lehmann et al. (1997), assim como Yamamoto et al. (1989), relatam que a infecção pelo FIV sob condições de campo é associada a várias anormalidades hematológicas, como leucopenia, linfopenia e neutropenia. Há várias explicações possíveis para a ausência de alterações significativas nas contagens de glóbulos brancos e de células sanguíneas diferenciais no presente estudo. Elas se referem ao número de gatos infectados estudados, à cepa infectante, às coinfeções existentes e a outras variáveis. De fato, o número de gatos infectados foi pequeno e portanto reduzida a chance que tivemos de observar diferenças estatísticas significativas. Houve também o desconhecimento da virulência da cepa infectante. Importante salientar que as coinfeções existentes neste trabalho são possivelmente diferentes daquelas encontradas nos trabalhos citados. Outras variáveis, como idade e ambiente em que

viviam, podem influenciar diferentemente na origem e no desenvolvimento da infecção.

Apenas a perda de peso apresentou associação significativa com os animais positivos para o FIV seguindo o teste ELISA. Todas as outras alterações citadas nos animais positivos não demonstraram significância quando analisadas pelo teste de Fisher. Esta alteração já foi encontrada por outros autores em animais naturalmente infectados (Yamamoto et al., 1989). Em humanos infectados por HIV do tipo 1 esta alteração está bem estudada e caracterizada como síndrome da perda. Weinroth et al. (1995) relatam que esta complicação é bastante comum em pacientes com AIDS. Neste trabalho os autores afirmam que esta síndrome é causada por um processo multifatorial incluindo dietas inadequadas, má absorção intestinal, desordens metabólicas e atividade de citoquinas. O início desta alteração está associada com infecções oportunistas acompanhadas de hipermetabolismo. Os autores relatam participação de TNF, interleucina 1, interleucina 6 e interferon alfa nesta síndrome.

O sexo não foi considerado um fator estatisticamente significativo quanto a predisposição ao FIV. Esse dado também foi encontrado em outro estudo no Brasil realizado por Souza et al. (2002), porém contraria ao de Shelton et al. (1995), e ao de Hosie et al. (1989) que verificam maior predisposição dos machos ao FIV.

Este trabalho, além de apresentar o levantamento da frequência do FIV em gatos capturados na rua na cidade de Belo Horizonte, traz informações em relação aos aspectos clínicos da doença em animais naturalmente infectados e demonstra que as técnicas de PCR e ELISA para detecção do vírus da imunodeficiência apresentaram sensibilidade e especificidade semelhantes.

6 CONCLUSÕES

- FIV e FeLV ocorrem na população de gatos domésticos capturados na rua de Belo Horizonte mantidos em abrigos.
- Não foi encontrada associação entre o FIV e achados hematológicos e clínicos exceto para perda de peso. Desta forma a realização de testes de diagnósticos para o FIV em animais sintomáticos e assintomáticos é de suma importância.
- O teste de ELISA e a PCR apresentaram sensibilidade e especificidades semelhantes, nas 40 amostras testadas, e podem desta forma ser utilizados na triagem no diagnóstico para a Imunodeficiência Felina.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARJONA, A.; ESCOLAR, E.; SOTO, I.; BARQUERO, N.; MARTIN, D.; GOMEZ-LUCIA, E. Seroepidemiological survey of infection by feline leukemia virus and immunodeficiency virus in Madrid and correlation with some clinical aspects. *J. Clin. Microbiol.*, v. 38, n. 9, p.3448-3449, 2000.
- AVRAMEAS, A.; STROSBERG, A. D.; MORAILLON, A.; SONIGO, P.; PANCINO, G. Serological diagnosis of feline immunodeficiency virus infection based on synthetic peptides from Env glycoproteins. *Res. Virol.*, v. 144, n. 3, p.209-218, 1993.
- AVRAMEAS, A.; GULLET, J. G.; CHOUCANE, L.; MORALLON, A.; SONIGO, P.; STROSBERG, A. D. Localization of three epitopes of the env protein of feline immunodeficiency virus. *Mol. Immunol.*, v. 29, n. 5, p.565-572, 1992.
- BACHMANN, M. H.; MATHIASON-DUBARD, C.; LEARN, G. H. et al. Genetic diversity of feline immunodeficiency virus: dual infection, recombination, and distinct evolutionary rates among envelope sequence clades. *J. Virol.*, v. 71, n. 6, p.4241-4253, 1997.
- BANDECCHI, P.; MATTEUCI, D.; BALDINOTTI, F.; GUIDI, G.; ABRAMO, F.; TOZZINI, F.; BENDINELLI, M. Prevalence of feline immunodeficiency virus and other retroviral infections in sick cats in Italy. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 31, n. 3-4, p.337-345, 1992.
- BARR, M. C.; POUGH, M. B.; JACOBSON, R. H.; SCOTT, F. W. Comparison and interpretation of diagnostic tests for feline immunodeficiency virus infection. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 199, n. 10, p.1377-1381, 1991.
- BARR, M. C. FIV, FeLV, and FIPV: interpretation and misinterpretation of serological test results. *Semin. Vet. Med. Surg. Small Anim.*, v. 11, n. 3, p.144-153, 1996.
- BARR, F. Feline Leukemia Virus. *J. Small Anim. Pract.*, v. 39, n. 1, p.41-43, 1998.
- BELÁK, S.; BALLAGI-PORDÁNY, A. Application of the polymerase chain reaction (PCR) in veterinary diagnostic virology. *Vet. Res. Comm.*, v. 17, n. 1, p.55-72, 1993.
- BELÁK, S.; THOREN, P. Molecular diagnosis of animal diseases: some experiences over the past decade. *Expert. Rev. Mol. Diagn.*, v. 1, n. 4, p.434-443, 2001.
- BENDINELLI, M.; PISTELLO, M.; LOMBARDI, S.; POLI, A.; GARZELLI, C.; MATTEUCCI, D.; CECCHERINI-NELLI, L.; MALVALDI, G.; TOZZINI, F. Feline immunodeficiency virus: an interesting model for AIDS studies and an important cat pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.*, v. 8, n. 1, p.87-112, 1995.

- BIENZLE, D.; REGGETI, F.; WEN, X.; LITTLE, S.; HOBSON, J.; KRUTH, S. The variability of serological and molecular diagnosis of feline immunodeficiency virus infection. *Can. Vet. J.*, v. 45, n. 9, p.753-757, 2004.
- BRALEY, J. FeLV and FIV: survey shows prevalence in the United States and Europe. *Feline Practice*, v. 22, n. 2, p.25-28, 1994.
- BROWN, E. W.; YUHKI, N.; PACKER, C.; O'BRIEN, S. J. A lion lentivirus related to feline immunodeficiency virus: epidemiologic and phylogenetic aspects. *J. Virol.*, v. 68, n. 9, p.5953-5968, 1994.
- CALDAS, A. P. F.; LEAL, E. S.; SILVA, E. F. A.; RAVAZZOLO, A. P. Detecção do provírus da Imunodeficiência Felina em gatos domésticos pela técnica de reação em cadeia da polimerase. *Pesq. Vet. Brás.*, v. 20, n. 1, p.20-25, 2000.
- CALLANAN, J. J.; HOSIE, M. J.; JARRETT, O. Transmission of feline immunodeficiency virus from mother kitten. *Vet. Rec.*, v. 128, n. 14, p.332-333, 1991.
- CAMARGOS, M. F. *Vírus da Leucemia Bovina: Epidemiologia Molecular e Diagnóstico*. 2005. 95 p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais. Universidade Federal de Minas Gerais, MG.
- CARLSON, J. R.; YEE, J.; HINRICHS, S. H.; BRYANT, M. L.; GARDNER, M. B.; PEDERSEN, N. C. Comparison of indirect immunofluorescence and Western Blot for detection of anti-human immunodeficiency virus antibodies. *J. Clin. Microbiol.*, v. 25, n. 3, p.494-497, 1987.
- CAXITO, F. A. *Detecção de subtipagem do vírus da imunodeficiência felina em Minas Gerais*. 2003. 90 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biológicas. Universidade Federal de Minas Gerais, MG.
- CAXITO, F. A.; RESENDE, M. Feline immunodeficiency virus: a review. *Virus Reviews and Research*, v. 9, n. 2, p.7-17, 2004.
- COELHO, F. M. *Ocorrência do DNA proviral do vírus da leucemia felina em Felis catus detectado por Nested – PCR*. 2003. 99 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biológicas. Universidade Federal de Minas Gerais, MG.
- COHEN, J. Jitters jeopardize AIDS vaccine trials. *Science*, v. 262, n. 5136, p.980-981, 1993.
- DANDEKAR, S.; BEEBE, A. M.; BARLOUGH, J.; PHILLIPS, T.; ELDER, J.; TORTEN, M.; PEDERSEN, N. Detection of feline immunodeficiency virus (FIV) nucleic acids in FIV-seronegatives cats. *J. Virol.*, v. 66, n. 7, p.4040-4049, 1992.
- DEACON, N. J.; LEAH, M. The potential of the polymerase chain reaction in veterinary research and diagnosis. *Aust. Vet. J.*, v. 66, n. 12, p.442-444, 1989.
- EAVES, F. W.; MOLLOY, J. B.; DIMMOCK, C. K. et al. A field evaluation of the polymerase chain reaction procedure for the detection of bovine leukemia virus proviral DNA in cattle. *Vet. Microbiol.*, v. 39, n. 4, p.313-321, 1994.
- EGBERINK, H. F.; KELDERMANS, E. J.; KOOLEN, M. J. M.; HORZINEK, M. C. Hummoral immune response to feline immunodeficiency virus in cats with experimentally induced and naturally acquired infections. *Am. J. Vet. Res.*, v. 53, n. 7, p.1133-1138, 1992.
- EGBERINK, H. F.; EDERVEEN, J. R.; MONTELARO, C.; PEDERSEN, N. C.; HORZINEK, M. C.; KOOLEN, M. J. Intracellular proteins of feline immunodeficiency virus and their antigenic relationship with equine infectious anemia virus proteins. *J. Gen. Virol.*, v. 71, n. Pt 3, p.739-743, 1990.

ELNIFRO, E. M.; ASHSHI, A. M.; COOPER, R. J.; KLAPPER, P. E. Multiplex PCR: optimization and application in diagnostic virology. *Clin. Microbiol. Rev.*, v. 13, n. 4, p.559-570, 2000.

FONTENOT, J. D.; HOOVER, E. A.; ELDER, J. H.; MONTELARO, R. C. Evaluation of feline immunodeficiency virus and feline leukemia virus transmembrane peptides for serological diagnosis. *J. Clin. Microbiol.*, v. 30, n. 7, p.1885-1890, 1992.

HAGIWARA, M. K.; RECHE Jr., A., LUCAS, S. R. R. Estudo clínico da infecção de felinos pelo vírus da leucemia felina em São Paulo. *Rev.Bras. Ciênc. Vet.* v. 4, n.1, p.35-38, 1997.

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

HERRING, I. P.; TROY, G. C.; TOTH, T. E.; CHAMPAGNE, E. S.; PICKETT, P.; HAINES, D. M. Feline leukemia virus detection in corneal tissues of cats by polymerase chain reaction and immunohistochemistry. *Veterinary Ophthalmology*, v. 4, n. 6, p.119-126, 2001.

HOFMANN-LEHMANN, R.; HOLZNAGEL, E.; OSSENT, P.; LUTZ, H. Parameters of disease progression in long-term experimental feline retrovirus (feline immunodeficiency virus and feline leukemia virus) infections: hematology, clinical chemistry, and lymphocyte subsets. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, v. 4, n. 1, p.33-42, 1997.

HOHDATSU, T.; YAMADA, M.; OKADA, M.; FUKASAWA, M.; WATANABE, K.; OGASAWARA, T.; TAKAGI, M.; AIZAWA, C.; HAYAMI, M.; KOYAMA, H. Detection of feline immunodeficiency proviral DNA in peripheral blood lymphocytes by the polymerase chain reaction. *Vet. Microbiol.*, v. 30, n. 2-3, p.113-123, 1992.

HOSIE, M. J.; JARRETT, O. Serological responses of cats to feline immunodeficiency virus. *AIDS*, v. 4, n. 3, p. 215-220, 1990.

HOSIE, M. J.; ROBERTSON, C.; JARRETT, O. Prevalence of feline leukaemia antibodies to feline immunodeficiency virus in cats in the United Kingdom. *Vet. Rec.*, v. 125, n. 11, p.293-297, 1989.

ISHIDA, T.; WASHIZU, T.; TORIYABE, K.; MOTOYOSHI, S.; TOMODA, I.; PEDERSEN, N. C. Feline immunodeficiency virus in cats of Japn. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 194, n. 2, p.221-225, 1989.

ISHIDA, T.; TOMODA, I. Clinical staging of feline immunodeficiency virus infection. *Jpn. J. Vet. Sci.*, v. 52, n. 3, p.645-648, 1990.

JAIN, N. C. Schalm's Veterinary hematology. Philadelphia: Lea & Fabiger, 1986. 1221 p.

JARRETT, O. Strategies of retrovirus survival in the cat. *Vet. Microb.*, v. 69, n. 1-2, p.99-107, 1999.

JORDAN, H. L.; HOWARD, J.; BARR, M. C.; KENNEDY-STOSKOPF, S.; LEVY, J. K.; TOMPKINS, W. A. Feline immunodeficiency virus is shed in semen from experimentally and naturally infected cats. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, v. 14, n. 12, p.1087-1092, 1998.

KAKINUMA, S.; MOTOKAWA, K.; HOHDATSU, T.; YAMAMOTO, J. K.; KOYAMA, H.; HASHIMOTO, H. Nucleotide sequence of feline immunodeficiency virus: classification of Japanese isolates into two subtypes which are distinct from non-Japanese subtypes. *J. Virol.*, v. 69, n. 6, p.3639-3646, 1995.

KANZAKI, L. I.; LOONEY, D. J. Feline immunodeficiency virus: a concise review. *Front. Biosci.*, v. 9, n. 1, p.370-377, 2004.

- KLINTEVALL, K.; BALLAGI-PORDANY, A.; NASLUND, K. et al. Bovine leukemia virus: rapid detection of proviral DNA by nested PCR in blood and organs of experimentally infected calves. *Vet. Microb.*, v. 42, n. 2, p.191-204, 1994.
- KYAW-TANNER, M. T.; ROBINSON, W. F. Quasispecies and naturally occurring superinfection in feline immunodeficiency virus infection. *Arch. Virol.*, v. 141, n. 9, p.1703-1713, 1996.
- KYAW-TANNER, M. T.; GREENE, W. K.; PARK, H. S.; ROBINSON, W. F. The induction of in vivo superinfection and recombination using feline immunodeficiency virus as the model. *Arch. Virol.*, v. 138, n. 3-4, p.261-271, 1994.
- LEVY, J. K.; CRAWFORD, P. C.; SLATER, M. R. Effect of vaccination against feline immunodeficiency virus on results of serologic testing in cats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 225, n. 7, p.1558-1561, 2004.
- LOMBARDI S.; GARZELLI, C.; LA ROSA, C.; ZACCARO, L.; SPECTER, S.; MALVALDI, G.; TOZZINI, F.; ESPOSITO, F.; BENDINELLI, M. Identification of a linear neutralization site within the third variable region of the feline immunodeficiency virus envelope. *J. Virol.*, v. 67, n. 8, p.4742-4749, 1993.
- LUCAS, S. R. R.; HAGIWARA, M. K.; RECHE JR., A.; GERMANO, E. P. M. L. Ocorrência de anticorpos antitoxoplasma em gatos infectados naturalmente pelo vírus da imunodeficiência dos felinos. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, v. 35, n. 1, p.41-45, 1998.
- LURIA, B. J.; LEVY, J. K.; LAPPIN, M. R.; BREITSCHWERDT, E. B.; LEGENDRE, A. M.; HERNANDEZ, J. A.; GORMAN, S. P.; LEE, I. T. Prevalence of infectious diseases in feral cats in Northern Florida. *J. Feline Méd.Surg.*, v. 6, n. 5, p.287-296, 2004.
- LUTZ, H.; JARRET, O. Detection of feline leukemia virus infection in saliva. *J. Clin. Microbiol.*, v. 25, n. 9, p.827-831, 1987.
- MALIK, R.; WIGNEY, D. I.; MUIR, D. B.; GREGORY, J. D.; LOVE, D. N. Cryptococcosis in cats: clinical and mycological assessment of 29 cases and evaluation of treatment using orally administered fluconazole. *J. Med. Vet. Mycol.*, v. 30, n. 2, p.133-144, 1992.
- MALIK, R.; KENDALL, K.; CRIDLAND, J. et al. Prevalences of feline leukaemia virus and feline immunodeficiency virus infections in cats in Sydney. *Aust. Vet. J.*, v. 75, n. 5, p.323-327, 1997.
- MEHL, M. L. Feline leukemia virus. In: LAPPIN, M. R. *Feline Internal Medicine Secrets*. Philadelphia: Hanley & Belfus.c. 2001. cap. 76.p. 387-391.
- MENDES-DE-ALMEIDA, F.; FARIA, M. C. F.; BRANCO, A. S.; SERRÃO, M. L.; SOUZA, A. M.; ALMOSNY, N.; CHAME, M.; LABARTHE, N. Sanitary conditions of colony of urban feral cats (*Felis catus* Linnaeus, 1758) in a Zoological Garden of Rio de Janeiro, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trp. S. Paulo*, v. 46, n. 5, p.269-274, 2004.
- MIYAZAWA, T. Infection of feline leukaemia virus and feline immunodeficiency virus. *Frontiers in Bioscience*, v. 7, n. 4, p.504-518, 2002.
- MOLLOY, J. B.; DIMMOCK, C. K.; EAVES, F. W. et al. Control fo bovine leucemia virus transmisión by selective culling of infected cattle on the basis oof viral antigen expresión in lymphocyte cultures. *Vet. Microb.*, v. 39, n. 4, p.323-333, 1994.
- MURTAUGH, M. P.; LIN, G. F.; HAGGARD, D. L. et al. Detection of Bovine Leukemia Virus in cattle by the polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods*, v. 33, n. 1, p.73-85, 1991.
- NATOLI, E.; SAY, L.; CAFAZZO, S.; BONANNI, R.; SCHMID, M.; PONTIER, D. Bold attitude makes male urban feral domestic cats more vulnerable to Feline Immunodeficiency Virus. *Neurosci. Biobehav.*, v. 29, n. 1, p.151-157, 2005.

- NORSWORTHY, G. D. Feline leukemia virus diseases. In: NORSWORTHY, G. D. *Feline Practice*. Philadelphia: J. B. Lippincott Company. 1993. cap.39. p. 360-368.
- OLMSTED, R. A.; HIRSCH, V. M.; PURCELL, R. H.; JOHNSON, P. R. Nucleotide sequence analysis of feline immunodeficiency virus: Genome organization and relationship to other lentiviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 86, n. 20, p.8088-8092, 1989.
- PANCINO G.; CHAPPEY, C.; SAURIN, W.; SONIGO, P. B epitopes and selection pressures in feline immunodeficiency virus envelope glycoproteins. *J. Virol.*, v. 67, n. 2, p.664-672, 1993.
- PEDERSEN, N. C.; HO, E. W.; BROWN, M. L.; YAMAMOTO, J. K. Isolation of a T-lymphotropic virus from domestic cats with an immunodeficiency-like syndrome. *Science*, v. 235, n. 3, p.790-793, 1987.
- PEDERSEN, N. C.; YAMAMOTO, J. K.; ISHIDA, T.; HANSEN, H. Feline immunodeficiency virus infection. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 21, n. 1, p.111-129, 1989.
- POLI, A.; GIANNELLI, C.; PISTELLO, M.; ZACCARO, L.; PIERACCI, D.; BENDINELLI, M.; MALVALDI, G. Detection of salivary antibodies in cats infected with feline immunodeficiency virus. *J. Clin. Microbiol.*, v. 30, n. 8, p.2038-2041, 1992.
- RECHE JR., A.; HAGIWARA, M. K.; LUCAS, S. R. R. Clinical study of acquired immunodeficiência syndrome in domestic cats in São Paulo. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, v. 34, n. 3, p.152-155, 1997.
- REGGETI F.; BIENZLE, D. Feline immunodeficiency virus subtypes A, B, and C and intersubtype recombinants in Ontario, Canada. *J. Gen. Virol.*, v. 85, n. Pt 7, p.1843-1852, 2004.
- REID R. W.; BARR, M. C.; SCOTT, F. W. Retrospective serologic survey for the presence of feline immunodeficiency virus antibody: a comparison of ELISA and IFA techniques. *Cornell Vet.*, v. 82, n. 4, p.359-369, 1992.
- ROJKO, J. L.; HARDY, W. D. Feline leukemia virus and other retroviruses. In: SHERDING, R. G. *The Cat: Diseases and Clinical Management*. 2.ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company. 1994. Cap.11 p.263-432.
- ROLFS, A.; SCHELLER, I.; FINCKH, U. et al. *PCR: Clinical Diagnostic Research*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag. 1992. p.35.
- SAMBROOK, J.; FRITSEH, E. F.; MANIATIS, T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.1989. np.
- SAMPAIO, I. B. M. *Estatística aplicada à experimentação animal*. Belo Horizonte: Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia. 2002. p. 265.
- SHELTON, G. H.; LINENBERGER, M. L.; GRANT, C. K.; ABKOWITZ, J. L. Hematologic manifestations of feline immunodeficiency virus infection. *Blood.*, v. 76, n. 6, p.1104-1109, 1990.
- SHELTON, G. H.; LINENBERGER, E. M. L. Hematologic abnormalities associated with retroviral infections in the cat. *Semin. Vet. Med. Surg. Small. Anim.*, v. 10, n. 4, p.220-233, 1995.
- SOUZA, H. J. M.; TEIXEIRA, C. H. R.; GRAÇA, R. F. S. Estudo epidemiológico de infecções pelo vírus da leucemia e/ou imunodeficiência felina, em gatos domésticos do município do Rio de Janeiro. *Clínica Veterinária*, v. 36, n. 1-2, p.14-21, 2002.

SPARKES, A. H.; HOPPER, C. D.; MILLARD, W. G.; GRUFFYDD-JONES, T. J.; HARBOUR, D. A. Feline immunodeficiency virus infection. Clinicopathologic findings in 90 naturally occurring cases. *J. Vet. Intern. Med.*, v. 7, n. 2, p.85-90, 1993.

TALBOTT, R. L.; SPARGER, E. E.; LOVELACE, K. M.; FITCH, W. M.; PEDERSEN, N. C.; LUCIW, P. A.; ELDER, J. H. Nucleotide sequence and genomic organization of feline immunodeficiency virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, v. 86, n. 15, p.5743-5747, 1989.

UHL, E. W.; HEATON-JONES, T. G.; PU, R.; YAMAMOTO, J. K. FIV vaccine development and its importance to veterinary and human medicine: a review FIV vaccine 2002 update and review. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 90, n. 3-4, p.113-132, 2002.

WEINROTH, S. E.; PARENTI, D. M.; SIMON, G. L. Wasting syndrome in AIDS: pathophysiologic mechanisms and therapeutic approaches. *Infect. Agents Dis.*, v. 4, n. 2, p.76-94, 1995.

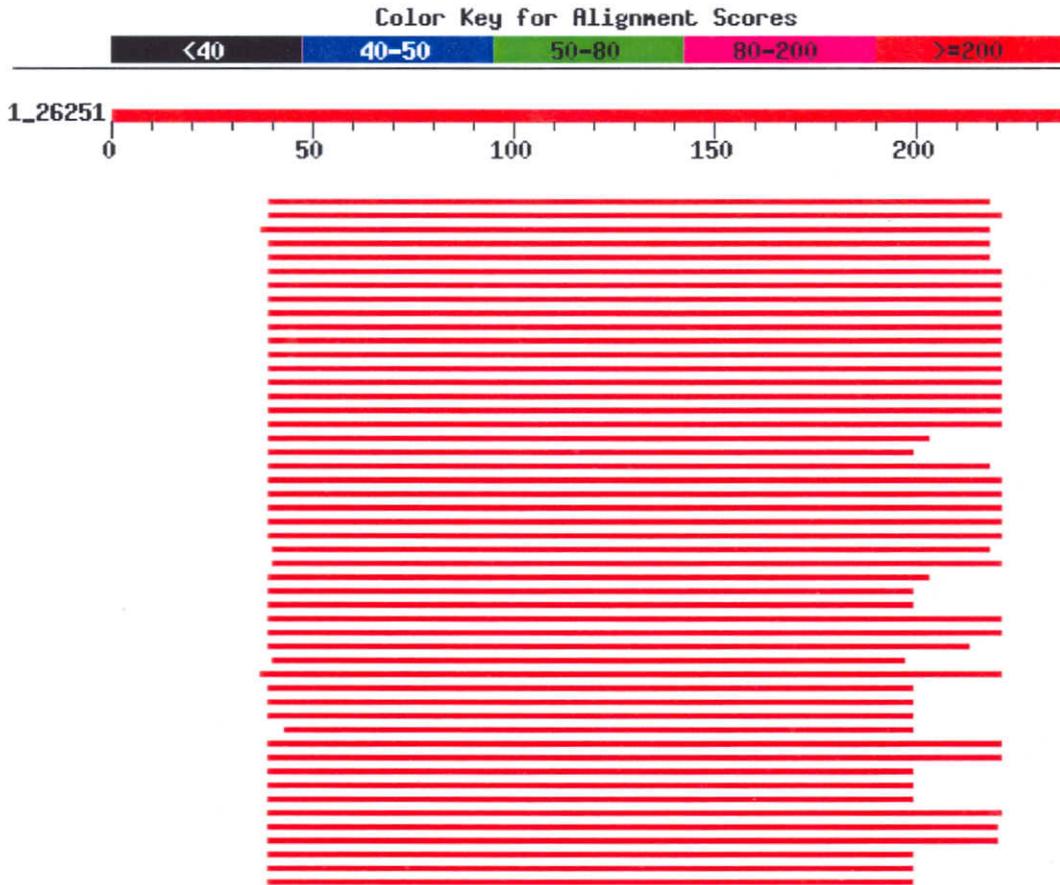
WILSON, K. M.; ROBINSON, W. F.; MITCHELHILL, K. I.; BUNDESEN, P. G.; KEMP, B. E. Autologous red cell agglutination test for antibodies to feline immunodeficiency virus. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 42, n. 3-4, p.253-263, 1994.

YAMAMOTO, J. K.; HANSEN, H. E.; HO, W.; MORISHITA, T. Y.; OKUDA, T.; SAWA, T. R.; NAKAMURA, R. M.; PEDERSEN, N. C. Epidemiologic and clinical aspects of Feline immunodeficiency virus infection in cats from the continental United States and Canada and possible mode of transmission. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 194, n. 2, p.213-220, 1989.

YAMAMOTO, J. K.; SPARGER, E. E.; HO, W.; ANDERSEN, P. R.; O'CONNOR, T. P.; MANDELL, C. P.; LOWENSTINE, L.; MUNN, R.; PEDERSEN, N. C. Pathogenesis of experimentally induced feline immunodeficiency virus infection in cats. *Am. J. Vet. Res.*, v. 49, n. 8, p.1246-1258, 1988.

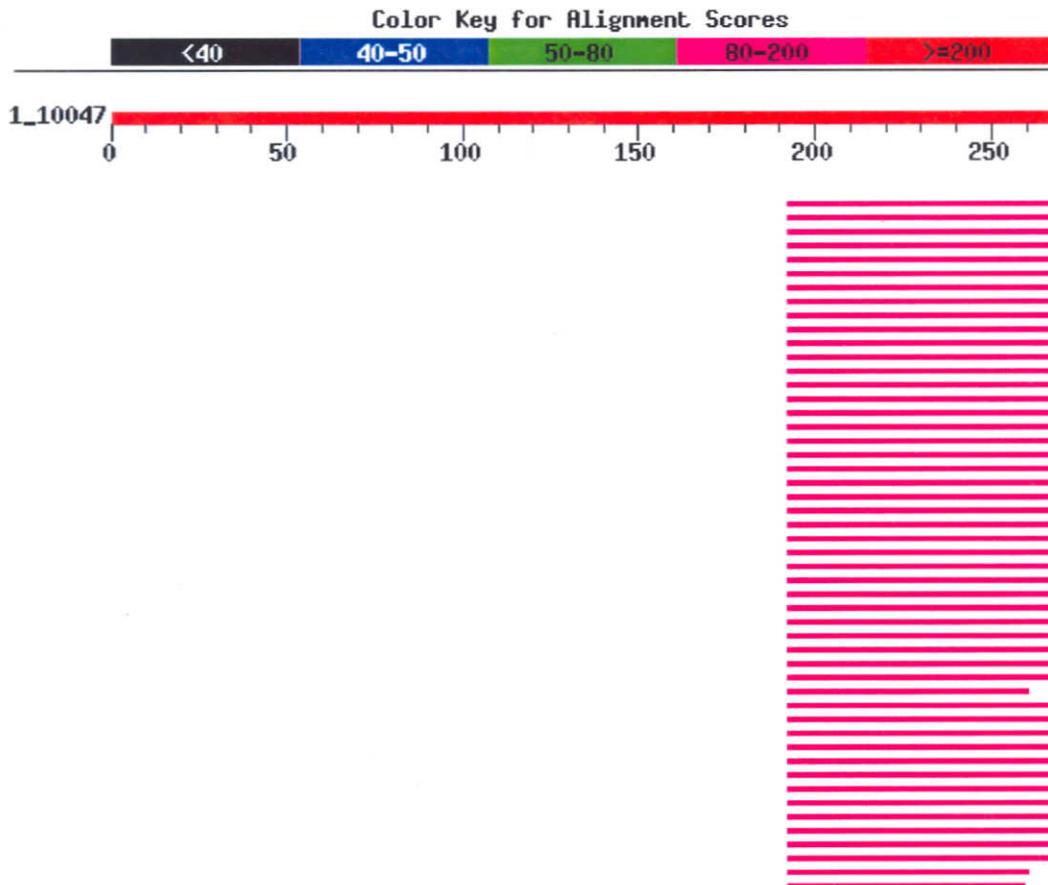
ZENGER, E. FIP, FeLV, FIV: making a diagnosis. *Feline Practice*, v. 28, n. 1, p. 16-18, 2000.

ANEXO -1 - Resultado BlastN da amostra 38



Sequences producing significant alignments:			Score (bits)	E Value
gi 38230432 gb AY369380.1	gb AY369380.1	Feline immunodeficiency virus is...	303	1e-79
gi 323948 gb M59418.1 FIVGVEPX	gb M59418.1 FIVGVEPX	Feline immunodeficiency viru..	301	4e-79
gi 24415505 gb AY139107.1	gb AY139107.1	Feline immunodeficiency virus st...	299	2e-78
gi 24415507 gb AY139108.1	gb AY139108.1	Feline immunodeficiency virus st...	295	3e-77
gi 24415503 gb AY139106.1	gb AY139106.1	Feline immunodeficiency virus st...	295	3e-77
gi 1490217 dbj D37824.1 FIVR	dbj D37824.1 FIVR	Feline immunodeficiency virus ...	293	1e-76
gi 23395032 gb AF531053.1	gb AF531053.1	Feline immunodeficiency virus IT...	285	3e-74
gi 23395030 gb AF531052.1	gb AF531052.1	Feline immunodeficiency virus IT...	285	3e-74
gi 37788880 gb AY220068.1	gb AY220068.1	Feline immunodeficiency virus is...	285	3e-74
gi 555797 gb U11820.1 FIU11820	gb U11820.1 FIU11820	Feline immunodeficiency viru...	285	3e-74
gi 24415514 gb AY139112.1	gb AY139112.1	Feline immunodeficiency virus st...	285	3e-74
gi 1490215 dbj D37823.1 FIVQ	dbj D37823.1 FIVQ	Feline immunodeficiency virus ...	285	3e-74
gi 23395028 gb AF531051.1	gb AF531051.1	Feline immunodeficiency virus DE...	278	6e-72
gi 37788886 gb AY220071.1	gb AY220071.1	Feline immunodeficiency virus is...	278	6e-72
gi 37788878 gb AY220067.1	gb AY220067.1	Feline immunodeficiency virus is...	278	6e-72
gi 41058684 gb AY500850.1	gb AY500850.1	Feline immunodeficiency virus st...	278	6e-72
gi 1490219 dbj D37819.1 FIVT	dbj D37819.1 FIVT	Feline immunodeficiency virus ...	278	6e-72
gi 2204190 emb Z96132.1 FIVZ96132	emb Z96132.1 FIVZ96132	Feline immunodeficiency v...	274	1e-70
gi 2204170 emb Z96122.1 FIVZ96122	emb Z96122.1 FIVZ96122	Feline immunodeficiency v...	274	1e-70
gi 24415501 gb AY139105.1	gb AY139105.1	Feline immunodeficiency virus st...	272	4e-70

ANEXO - 2 - Resultado BlastN da amostra 41



Sequences producing significant alignments:	Score	E
	(bits)	Value
gi 555797 gb U11820.1 FIU11820 Feline immunodeficiency viru...	145	7e-32
gi 1490215 dbj D37823.1 FIVQ Feline immunodeficiency virus ...	145	7e-32
gi 1490211 dbj D37821.1 FIVO Feline immunodeficiency virus ...	145	7e-32
gi 1490219 dbj D37819.1 FIVT Feline immunodeficiency virus ...	145	7e-32
gi 323948 gb M59418.1 FIVGVEPX Feline immunodeficiency viru...	145	7e-32
gi 23395026 gb AF531050.1 Feline immunodeficiency virus AT...	137	2e-29
gi 23395024 gb AF531049.1 Feline immunodeficiency virus AT...	137	2e-29
gi 2204190 emb Z96132.1 FIVZ96132 Feline immunodeficiency v...	137	2e-29
gi 2204188 emb Z96131.1 FIVZ96131 Feline immunodeficiency v...	137	2e-29
gi 2204186 emb Z96130.1 FIVZ96130 Feline immunodeficiency v...	137	2e-29
gi 2204172 emb Z96123.1 FIVZ96123 Feline immunodeficiency v...	137	2e-29
gi 2204170 emb Z96122.1 FIVZ96122 Feline immunodeficiency v...	137	2e-29
gi 2204164 emb Z96119.1 FIVZ96119 Feline immunodeficiency v...	137	2e-29
gi 2204158 emb Z96116.1 FIVZ96116 Feline immunodeficiency v...	137	2e-29
gi 2204148 emb Z96111.1 FIVZ96111 Feline immunodeficiency v...	137	2e-29
gi 2204141 emb Z96108.1 FIVZ96108 Feline immunodeficiency v...	137	2e-29
gi 24415507 gb AY139108.1 Feline immunodeficiency virus st...	137	2e-29
gi 24415503 gb AY139106.1 Feline immunodeficiency virus st...	137	2e-29
gi 24415501 gb AY139105.1 Feline immunodeficiency virus st...	137	2e-29
gi 1490217 dbj D37824.1 FIVR Feline immunodeficiency virus ...	137	2e-29