

Fabiana Alves

**PADRONIZAÇÃO DE UM ELISA INDIRETO PARA O DIAGNÓSTICO
DA IMUNODEFICIÊNCIA FELINA A VÍRUS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre.

Área de concentração: Medicina Veterinária Preventiva

Orientador: Prof. Dr. Jenner Karlisson Pimenta dos Reis

Belo Horizonte
Escola de Veterinária - UFMG
2010

A474p Alves, Fabiana, 1981–
Padronização de um ELISA indireto para o diagnóstico da imunodeficiência felina a vírus / Fabiana Alves. – 2010.
32 p. : il.

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

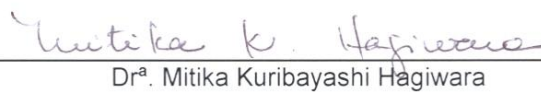
1. Gato – Doenças – Teses. 2. Vírus da imunodeficiência em felino – Teses.
3. Teste imunoenzimático – Teses. I. Reis, Jenner Karlisson Pimenta dos.
II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 636.808 969


Dissertação defendida e aprovada em 14 de Dezembro de 2010, pela Comissão Examinadora constituída por:



Prof. Jenner Karlisson Pimenta dos Reis
Orientador



Dr.ª Mitika Kuribayashi Hagiwara



Prof. Rômulo Cerqueira Leite

*"Há homens que lutam um dia e são bons.
Há outros que lutam um ano e são melhores.
Há os que lutam muitos anos e são muito bons.
Porém, há os que lutam toda a vida.
Esses são os imprescindíveis."*

(Bertolt Brecht).

*Dedico esse trabalho ao meu marido
Francisco pelo amor compartilhado, paciência e
companheirismo; e aos meus pais por serem
imprescindíveis na minha vida.*

Se tudo fosse fácil, de que seria a dedicação e a esperança.
Fabiana Alves

AGRADECIMENTOS

A Deus por sua eterna presença em meu caminho, me guiando às portas corretas e tornando possível a realização dos meus sonhos.

Ao meu orientador professor Dr. Jenner Karlisson Pimenta dos Reis, por ter me recebido de portas abertas no RETROLAB, pelo profissionalismo, por ser tão agradável e por ter me orientado de forma exemplar durante todo o meu mestrado.

Ao Prof. Dr. Rômulo Cerqueira Leite, por ter me recebido durante a iniciação científica, me aceitado como orientanda no mestrado e por ser um exemplo de pessoa e profissional. Agradeço as oportunidades únicas que o senhor me proporcionou e por me ensinar a construir uma carreira digna. Muito obrigada por todos os ensinamentos!

Ao Prof. Dr. Carlos Mazur, por ter me confiado à continuidade de seu projeto e por ter me ensinado muito durante o desenvolvimento desta dissertação.

Ao Prof. Dr. Almir de Sousa Martins, meu muito obrigado por ter me iniciado na pesquisa, pelas oportunidades, pela confiança que me dispensou, pela amizade e por tornar um laboratório de pesquisa um ambiente tão familiar e agradável! Muito obrigada!

Ao Prof. Dr. Marcos Brain Heinnemam, por estar sempre disposto a ajudar dando conselhos e sugestões tão preciosas.

Aos meus pais, simplesmente por existirem! Agradeço a criação que vocês me deram, agradeço as oportunidades que vocês me proporcionaram mesmo nos momentos mais difíceis. E afirmo que tudo que estou conseguindo é porque tive bases fortes. Dedico todo a minha satisfação e felicidade a vocês. Amo vocês intensamente!

Ao meu marido Francisco, pelo amor, pelo apoio, pelo companheirismo, pela amizade, pela compreensão nos momentos difíceis e agradeço profundamente por você fazer parte da minha vida!

Aos meus irmãos, em ordem alfabética para não ter ciúmes: Alexandre, Andréia e Robson. Agradeço a vocês a união, o amor, o companheirismo e a felicidade que temos.

Aos meus sobrinhos lindinhos e amorzinhos da minha vida também em ordem alfabética: Gabriel, Henrique, Lucas, Rodrigo e Vitor. Amo vocês!!!...

À Sra. Elza e Sr. Duílio por serem tão amáveis, agradáveis e por me tratarem com filha. Muito obrigada pelo apoio!

Aos meus cunhados Ana Paula, Andréia, Clemerson e Diego, por fazerem parte da família!

À Suely Siqueira Leite por ser tão agradável e companheira.

À Helen Lima Del Puerto, amiga e companheira lhe agradeço pela constante força nos momentos difíceis, por compartilhar todos os momentos de glória e por fazer parte da minha vida. Tenho por você uma eterna admiração profissional e pessoal. Hoje, dedico este trabalho principalmente a você por ter me ajudado abrindo tantas portas, compartilhado tantos conhecimentos e por ter me proporcionado grandes oportunidades.

À Gissandra Farias Braz, por ter entrado de “para-quedas” no meu caminho e ter me adotado como amiga. Obrigada, pela grande ajuda, pela amizade, pelo companheirismo, pelos trabalhos compartilhadas com tanto carinho e pela boa vontade. Também dedico esse trabalho a você! Obrigada por tudo!

Marisa agradeço sua amizade! Eu sei que vai durar pelo resto de nossas vidas, mesmo com a distância do “tempo”.

À Daniela de Souza Rajão, pelas traduções, amizade, trabalhos compartilhados e companheirismo no laboratório!

À Fernanda Gonçalves de Oliveira, pela amizade e companheirismo no laboratório!

À Rejane pela enorme ajuda nas análises estatísticas e pelos grandes conselhos.

À Elizangela por ter me ajudado no início do meu trabalho e por ser uma das integrantes da família RETROLAB.

À família RETROLAB: Cairo, Paula, André e Juliana, local de total alegria e prazer em trabalhar!

Ao Eduardo, Nádia, Grazi, Anita, Doris e Graciele pela constante ajuda e coleguismo!

À Sarah pela companhia e amizade compartilhada!

À professora Dra. Maria Esther por ser tão gentil, amiga e por ter nos ajudado tanto.

Às professoras Márcia Amorim, Karen e Linaena por serem tão agradáveis e profissionais.

Aos professores Dani, Marina, Marília, Denilson, Flávia, Fábio, Fernando, Elisa, Simone, Ricardo e Hudson por sempre terem torcido por mim! Muito obrigada!

À professora Dra. Mitika Kuribayashi Hagiwara pelas amostras doadas para nosso estudo.

À professora Dra. Adriane Pimenta da Costa Val e sua aluna Shemina Romano Diniz pelas amostras compartilhadas.

Prof. Dr. Cleuza Maria de Faria Resende e seu aluno Plínio Ferreira Mantovane pelas amostras cedidas.

À médica veterinária Elizabeth Maria R. N. Jardim Biondini e sua equipe, da Clínica Veterinária Recanto Animal, pela colaboração e pelas amostras cedidas gentilmente.

À Carolina do Recanto Animal por ter cedido as amostras tão gentilmente e pelo seu lindo trabalho no abrigo AmiCat's.

A todos que ajudaram direta ou indiretamente durante a produção deste trabalho.

Ao CNPq que conferiu minha bolsa de estudos.

À FAPEMIG, FEPMZ e INCT pela ajuda financeira em eventos.

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	12
1. INTRODUÇÃO	13
2. LITERATURA CONSULTADA	13
2.1. Vírus da imunodeficiência felina.....	13
2.2. Epidemiologia	14
2.3. Transmissão e sinais clínicos.....	14
2.4. Patogenia.....	14
2.5. Diagnóstico e profilaxia.....	15
3. MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1. Coleta de material clínico	16
3.2. Controles	16
3.3. Teste ouro	16
3.4. Diagnóstico molecular.....	16
3.4.1. Extração do DNA total	16
3.4.2. Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	17
3.4.3. Eletroforese dos produtos da PCR	17
3.5. Indução e expressão do antígeno recombinante r-p24	17
3.5.1. Produção do antígeno recombinante (r-p24)	17
3.5.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE.....	18
3.5.3. Purificação da proteína recombinante p-24 (r-p24)	18
3.6. Diagnóstico confirmatório e determinação da ocorrência do FIV na região metropolitana de BH	19
3.6.1. <i>Western blot</i>	19
3.7. Padronização do r-p24 ELISA	20
3.7.1. Padronização do r-p24 ELISA	20
3.8. Análise estatística.....	20
3.8.1. Definição do ponto de corte do r-p24 ELISA.....	20
3.8.2. Estudo comparativo dos testes SNAP, r-p24 ELISA, PCR e <i>Western blot</i>	20
3.8.3. Análise da ocorrência de FIV na região metropolitana de Belo Horizonte, Minas Gerais	21
4. RESULTADOS	21

4.1. Purificação da r-p24.....	21
4.2. Análise da reatividade da r-p24 através do <i>Western blot</i>	21
4.3. Padronização do r-p24 ELISA	21
4.3.1. Padronização e ponto de corte	21
4.3.2. Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo.....	23
4.4. Análise comparativa entre os testes SNAP, r-p24 ELISA, <i>Western blot</i> e PCR	23
5. DISCUSSÃO	25
6. - CONCLUSÃO	27
7. – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Análise da reatividade da r-p24 através da técnica de <i>Western blot</i> utilizando-se soros de gatos infectados pelo FIV nas diluições de 1:10 e 1:100 e conjugado na diluição de 1:1000.	21
Figura 2 - Gráfico representando a distribuição por densidade óptica (DO) dos soros em r-p24 ELISA comparada ao SNAP Combo Plus (Idexx Laboratories Inc One Idexx Dr, Westbrook, USA).	22
Figura 3 – Análise do ponto de corte convencional através da distribuição da densidade óptica (DO) dos soros em r-p24 ELISA comparada ao SNAP Combo Plus (Idexx Laboratories Inc One Idexx Dr, Westbrook, USA). 0 - Representa amostras negativas; e 1 - Representa amostras positivas.....	22
Figura 4 - Análise do ponto de corte através da curva ROC buscando o equilíbrio entre especificidade e sensibilidade. SNAP x ELISA: ponto de corte 0,528. 0 - Representa amostras negativas; e 1 - Representa amostras positivas.	23

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1 - Resumo de lavagens do protocolo 1 de purificação de proteínas utilizado para obtenção da r-p24.	18
Quadro 2 - Resumo de lavagens do protocolo 2 de purificação de proteínas utilizado para obtenção da r-p24.	19

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Análise comparativa entre os testes ELISA, <i>Western blot</i> e PCR quando comparados ao SNAP Combo Plus	23
Tabela 2 - Amostras com resultados divergentes nos testes PCR, SNAP Combo Plus, <i>Western blot</i> e ELISA.	24
Tabela 3 - Ocorrência do vírus da imunodeficiência felina na região metropolitana de Belo Horizonte, MG.	24

RESUMO

O Vírus da Imunodeficiência Felina (FIV) é um lentivírus que infecta os membros da família Felidae. A infecção causada pelo FIV leva a uma doença crônica e à imunodeficiência. O diagnóstico baseado apenas nos sinais clínicos não é confiável, o que torna necessário o diagnóstico laboratorial. O objetivo do presente trabalho foi estabelecer e padronizar uma prova de ELISA indireto, utilizando-se o antígeno recombinante da proteína de capsídeo p24, a r-p24, baseado na sequência genômica do FIV-B. Adicionalmente, uma avaliação da ocorrência da infecção na região metropolitana de Belo Horizonte foi realizada, utilizando-se as técnicas de PCR e imunocromatografia SNAP Combo Plus. Os resultados conflitantes quando comparado aos dois testes, foram confirmados a partir do *Western blot* utilizando-se a r-p24. Foram utilizadas 150 amostras de soro durante o experimento: 78 de gatos assintomáticos de proprietários particulares e de abrigos da região metropolitana de Belo Horizonte, Minas Gerais, e outras 72 amostras doadas pelo Departamento de Clínica Veterinária da Universidade de São Paulo (USP), SP, previamente testadas pelo SNAP Combo Plus e por PCR. Para a PCR foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores para amplificação de um fragmento de 244 pares de bases (pb) dentro da região correspondente ao gene *gag* do FIV. Para a técnica de *Western blot* foi utilizado o antígeno recombinante da proteína de capsídeo, a r-p24 (3,14 µg/cm = 0,095 µg/animal). O ELISA indireto foi padronizado utilizando-se 2,5 ng/ml da r-p24, soro na diluição de 1:320 e conjugado (peroxidase anti-felino IgG) na diluição de 1:7500. O r-p24 ELISA apresentou uma sensibilidade de 97% e uma especificidade de 93%, quando comparado ao teste ouro SNAP Combo Plus, com índice Kappa igual a 0,83. A partir da análise da ocorrência do FIV em Belo Horizonte, três animais (3,85%) foram positivos para o FIV, demonstrando que animais assintomáticos infectados são potenciais transmissores do vírus. Baseado nos dados obtidos da estabilização e padronização do teste, conclui-se que o r-p24 ELISA é uma técnica sensível, específica e prática para o diagnóstico de rotina e ou pesquisa da infecção pelo FIV.

Palavras-chave: Vírus da imunodeficiência felina, imunodeficiência felina, ELISA, r-p24, ocorrência, *Western blot*, PCR.

ABSTRACT

Feline immunodeficiency virus (FIV) is a lentivirus that infects felids. FIV infection leads to a chronic disease and immunodeficiency. Clinical diagnosis is not reliable, which makes laboratory diagnosis necessary. The aim of this study was to establish and standardize an indirect ELISA for diagnosis of FIV, using a capsid protein p24 recombinant antigen (r-p24). Additionally, the occurrence of FIV infection in the Belo Horizonte metropolitan area was studied using PCR and immunochromatography SNAP Combo Plus. Conflicting results between both tests were confirmed by *Western blot* using the r-p24. Serum samples from 150 cats were used: 78 from asymptomatic cats belonging to private owners and from shelters of Belo Horizonte metropolitan area, Minas Gerais, and additional 72 samples donated by Veterinary Clinic Department of Universidade de São Paulo (USP), SP, previously tested by SNAP Combo Plus and PCR. For the amplification 244 base pairs (bp) fragment of the FIV *gag* gene the oligonucleotide primers were designed. The r-p24 (3.14 µg/cm = 0.095 µg/animal) was used for the *Western blot*. The indirect ELISA was standardized using 2.5 ng/ml of r-p24, 1:320 serum dilution and conjugate diluted 1:7500 (anti-feline IgG peroxidase). The r-p24 ELISA showed a 97% sensitivity and 93% specificity when compared to the gold test SNAP Combo Plus, with a Kappa index of 0.83. For the FIV occurrence study in Belo Horizonte, three animals (3.85%) were positive, showing that infected asymptomatic cats can disseminate the virus. Our results indicate that r-p24 ELISA is a sensitive, specific, and simple technique for FIV routine diagnosis and research.

Keywords: Feline immunodeficiency virus, feline immunodeficiency, ELISA, r-p24, occurrence, *Western blot*, PCR.

1. INTRODUÇÃO

O Vírus da Imunodeficiência Felina (FIV) é um retrovírus que infecta os membros da família Felidae. Estudos demonstram que o FIV tem distribuição mundial e sua prevalência e incidência varia de acordo com o sexo, idade, estado de saúde e região geográfica.

Por ser um excelente modelo para o HIV/AIDS, o FIV é um dos retrovírus mais extensamente estudados. O FIV pode estabelecer infecção crônica e persistente em gatos domésticos (*Felis catus*), que podem permanecer assintomáticos por anos, atuando, portanto como disseminadores do vírus, ou levar à imunodeficiência progressiva.

Animais imunodeficientes estão sujeitos à infecções oportunistas e podem atuar como possíveis veiculadores de zoonoses. O diagnóstico precoce e o isolamento dos animais infectados são as principais formas de profilaxia para o FIV. Entretanto, o diagnóstico baseado apenas nos sinais clínicos, não é confiável, e demanda técnicas laboratoriais.

Existem técnicas sorológicas e moleculares, mas, trabalhos recentes têm demonstrado discrepâncias quanto aos resultados dos métodos utilizados. Atualmente, o ELISA é a técnica mais utilizada no diagnóstico da infecção pelo FIV, devido à sua alta sensibilidade, especificidade e praticidade. No entanto, no Brasil ainda há a necessidade da importação de kits a custos elevados, o que torna difícil a pesquisa e o diagnóstico desta doença.

O mercado de animais de companhia, principalmente de gatos domésticos está em pleno desenvolvimento e o diagnóstico utilizando kits importados ainda é muito elevado e restrito a uma pequena classe. Diante deste quadro torna-se necessário o estabelecimento e a padronização de um método de diagnóstico sensível, específico, rápido, prático e acessível como ferramenta

para o meio científico e para o diagnóstico de rotina do FIV no Brasil.

O principal objetivo deste trabalho foi estabelecer e padronizar um ELISA indireto utilizando o antígeno recombinante r-p24 do FIV-B para o diagnóstico sensível e específico do FIV. Os objetivos específicos foram avaliar a reatividade da proteína r-p24 do capsídeo viral no ELISA e no *Western blot* com soro de animais naturalmente infectados pelo FIV e analisar a ocorrência do FIV na região metropolitana de Belo Horizonte (BH), Minas Gerais.

2. LITERATURA CONSULTADA

2.1. Vírus da imunodeficiência felina

O Vírus da Imunodeficiência Felina (FIV) foi isolado pela primeira vez em 1986, em Petaluma na Califórnia – EUA, em um gatil onde os gatos apresentavam sinais de imunodeficiência, mas eram soronegativos para o vírus da Leucemia Felina (FeLV). Devido ao seu tropismo por linfócitos, o vírus foi inicialmente designado como lentivírus felino T-linfotrópico (FTLV) (Pedersen *et al.*, 1987).

O FIV é um retrovírus pertencente ao gênero *Lentivirus* que causa uma imunodeficiência crônica e progressiva, considerado como um dos principais patógenos de felinos domésticos (Pedersen *et al.*, 1987). O FIV é classificado em 5 subtipos (A, B, C, D e E), com base na variação nucleotídica da região V3 e V5 do gene *env* (Kurosawa *et al.*, 1999). No entanto, estudos em diversos países como Portugal, Nova Zelândia e EUA demonstraram que este número de subtipos poderá aumentar, devido à sua alta capacidade de sofrer mutações diante de pressões imunológicas, farmacológicas e ou ambientais (Duarte e Tavares, 2005; Hayward *et al.*, 2007; Weaver *et al.*, 2004).

O virion tem 100-125 nm de diâmetro, forma esférica e é envelopado (Pedersen *et al.*, 1987). O ácido nucléico é dimérico, consistindo de duas moléculas de RNA fita

simples com cerca de 9.474 nucleotídeos (NCBI - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/genome>). A estrutura genômica é constituída de três grandes quadros de leitura abertos (ORFs) *gag*, *pol* e *env*, que codificam as proteínas estruturais internas, a transcriptase reversa e outras enzimas, e as proteínas de envelope, respectivamente, além de vários pequenos ORFs que codificam proteínas regulatórias (Bendinelli *et al.*, 1995).

Em função da semelhança entre os vírus e seus processos patogênicos gatos infectados com FIV têm sido utilizados como modelo de estudo para Síndrome da Imunodeficiência Humana – AIDS (Bendinelli *et al.*, 1995).

2.2. Epidemiologia

A situação epidemiológica mundial mostra uma ampla distribuição do FIV, com taxas de prevalência variando desde 2,5% até 44% em todo mundo, as taxas de infecção de animais assintomáticos variam de 1 a 14% de acordo com a idade, sexo, regiões geográficas e risco de exposição (Hohdatsu *et al.*, 1998; Fuchs *et al.*, 1994; Yamamoto *et al.*, 1989). No Brasil, o subtipo B tem sido encontrado e a ocorrência do FIV no país oscilou entre 2,66% e 37,5% (Alves *et al.*, 2010; Caldas *et al.*, 2000; Lara *et al.*, 2007; Teixeira *et al.*, 2007; Caxito *et al.*, 2006).

2.3. Transmissão e sinais clínicos

A forma primária de transmissão natural é a saliva veiculada pela mordida de animais infectados. A transmissão intra-uterina, perinatal, pelo colostro, leite, ou pelo sêmen de animais soropositivos também pode ocorrer (O'neil *et al.*, 1995; Hartmann *et al.*, 1998).

A infecção pelo FIV pode levar seus hospedeiros a atuarem como eventuais fontes de uma série agentes infecciosos para outros animais e para o homem, em função da grave imunodeficiência que promove, incluindo toxoplasmas, bartonelas, o vírus da gripe pandêmica (H5N1) e

Cryptococcus neoformans entre outros (Ueno *et al.*, 1996; Malik *et al.*, 1992).

Clinicamente, a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida dos Felinos pode ser caracterizada por quatro fases: [1] a aguda, que pode durar de meses a anos, em que o animal infectado pode apresentar neutropenia, linfadenopatia e febre; [2] a assintomática, que pode durar anos, na qual o animal não apresenta sinais clínicos; [3] a ARC (*AIDS related complex*) pode levar meses a um ano para o gato infectado apresentar sintomas como linfadenopatia generalizada, febre recorrente, apatia, leucopenia, anemia, anorexia, perda de peso, estomatite crônica e alterações comportamentais; [4] a FAIDS (síndrome da imunodeficiência felina), que leva meses e o animal apresenta os sintomas apresentados na ARC mais as infecções oportunistas, neoplasias e anormalidades neurológicas (Hartmann, 1998).

A infecção tem associação com o gênero, comportamento, idade e estado de saúde dos animais. As taxas mais altas de infecção tem sido encontradas em gatos machos adultos, com livre acesso às ruas, os quais frequentemente apresentam comportamento agressivo (Lutz *et al.*, 1990; Bandecchi *et al.*, 1992; Ishida *et al.*, 1989; Hosie *et al.*, 1989; Braley, 1994).

2.4. Patogenia

O FIV se replica em linfócitos CD4⁺, CD8⁺ (Pedersen *et al.*, 1987), linfócitos B, macrófagos, bem como em células da microglia e astrócitos (Meeker *et al.*, 1999; Dow *et al.*, 1992). A infecção causa uma alta viremia, que decai após algumas semanas, com o desenvolvimento de uma imunidade parcial. Células T citotóxicas (CD8⁺) específicas para o FIV se desenvolvem logo após início da infecção e persistem ao longo do estágio assintomático da doença. Entretanto, a resposta imune normalmente não elimina o vírus e a fase aguda é seguida de uma etapa assintomática, que geralmente persiste por anos. A maioria dos animais infectados, eventualmente, sucumbe em função dos efeitos virais ou

pelas infecções secundárias resultantes da imunossupressão (Paillot *et al.*, 2005).

2.5. Diagnóstico e profilaxia

A detecção do vírus no plasma ou linfócitos de sangue periférico de animais infectados, por meio de isolamento em cultura de células, é possível ao longo de todo período da infecção, mas impraticável como diagnóstico de rotina (Barlough *et al.*, 1991).

Gatos infectados pelo FIV desenvolvem resposta imune humoral direcionada contra determinantes antigênicos das proteínas virais codificadas pelas regiões gênicas *gag* e *env* (Hosie e Jarrett, 1990, Egberink *et al.*, 1991, Pancino *et al.*, 1993, Lombardi *et al.*, 1993). O FIV normalmente é detectável em testes sorológicos de 2 a 6 semanas após a infecção, e os anticorpos dirigidos às proteínas imunogênicas desenvolvem-se ao mesmo tempo e tendem a permanecer em altos títulos por toda a vida do animal (Avrameas *et al.*, 1993; Fontenot *et al.*, 1992; Callanan *et al.*, 1991). Em filhotes não infectados, os anticorpos maternos declinam em 2 a 3 meses após o parto (Avrameas *et al.*, 1993; Fontenot *et al.*, 1992; Callanan *et al.*, 1991).

A detecção do DNA proviral do FIV em tecidos pela PCR tem sido descrita, sendo considerada altamente sensível e específica (Rimstad e Ueland, 1992; Dandekar *et al.*, 1992; Hodatsu, 1992). No entanto, a PCR pode apresentar falhas na detecção de vírus com variações genômicas (Caxito, 2003; Bachmann *et al.*, 1997; Bienzle *et al.*, 2004), e em baixos títulos virais (Pedersen *et al.*, 1989; Bienzle *et al.*, 2004).

A infecção pelo FIV é geralmente diagnosticada pela detecção de anticorpos específicos anti-FIV no sangue. Os anticorpos podem ser detectados pela imunofluorescência indireta, ELISA ou *Western blot* (Hartmann, 1998). Em inoculações experimentais, os anticorpos aparecem em 2 a 4 semanas e são geralmente detectáveis pelo resto da vida do animal (Yamamoto *et al.*, 1989). Para o diagnóstico do FIV, inúmeros testes sorológicos vêm sendo desenvolvidos

baseados em ELISA competitivos, de captura e indiretos, usando antígenos nativos, sintéticos ou recombinantes (Avrameas *et al.*, 1993; Calzolari *et al.*, 1995; Kashiwase *et al.*, 1997). Entre as diversas proteínas do FIV, o antígeno de CA (capsídeo), a glicoproteína TM (transmembrana) e SU (superfície) do envelope são as mais amplamente utilizadas (Calzolari *et al.*, 1995; Rosati *et al.*, 2004).

Após a identificação dos animais positivos, o controle pode ser realizado pelo isolamento dos animais infectados, reduzindo-se assim a possibilidade de transmissão. A limitação de gatos domésticos às ruas, também é uma forma de controle que pode reduzir o risco de contaminação (Ravazzollo e Costa, 2007).

Diversas vacinas experimentais inativadas, recombinantes e de DNA tem sido desenvolvidas. No entanto, a diversidade genética e antigênica dos isolados de campo tem dificultado seu sucesso e a sua utilização (Yamamoto *et al.*, 2007; Teixeira *et al.*, 2010). Vacinas inativadas tem demonstrado maior eficiência (Ravazzollo e Costa, 2007).

Em 2002, uma vacina contra o FIV subtipos A e D foi licenciada nos Estados Unidos (Uhl *et al.*, 2002; Yamamoto *et al.*, 2007). Pu *et al.* (2005) demonstraram que esta vacina também confere imunidade para animais infectados com o subtipo B (FIV-FC1).

Entretanto, sua eficácia em limitar a transmissão natural do vírus na população felina necessita de comprovação (Ravazzollo e Costa, 2007; Uhl *et al.*, 2002). A vacina é inativada e induz uma forte resposta humoral, no entanto, promove a formação de anticorpos indistinguíveis dos produzidos durante infecção natural e os métodos sorológicos não são capazes de promover a distinção entre animais vacinados e naturalmente infectados (Uhl *et al.*, 2002). Atualmente, existem muitos estudos buscando a diferenciação entre anticorpos de animais naturalmente infectados e vacinados a partir de métodos sorológicos (Kusuhara *et al.*, 2007; Levy *et al.*, 2008).

No Brasil ainda não há vacina comercialmente disponível no mercado contra a infecção pelo FIV (Teixeira *et al.*, 2010), o que não dificulta o diagnóstico sorológico, tornando-o confiável.

Alguns estudos demonstram resultados promissores com a utilização de interferon recombinante para o tratamento da infecção pelo FIV, aumentando a sobrevivência dos animais infectados. Drogas imunoestimuladoras e o AZT também são utilizadas, apresentando bons resultados em gatos infectados (Ravazzollo e Costa, 2007).

Diante da importância da doença, torna-se necessária a utilização de um método de diagnóstico sensível e específico, para o diagnóstico. O ELISA é considerado uma das principais técnicas para o diagnóstico do FIV. Apesar da sua ampla difusão e aplicação mundial, sua utilização no Brasil ainda depende da importação de kits a custos altamente restritivos. Este aspecto vem representando, talvez, um dos maiores obstáculos para viabilização do diagnóstico de rotina e pesquisas sobre o FIV no País.

Neste sentido, a padronização da prova de ELISA com a utilização de antígenos recombinantes, para o diagnóstico laboratorial e pesquisa da doença é um passo significativo para o estudo da Imunodeficiência Viral Felina no Brasil. Entre as vantagens da prova de ELISA estão incluídas a alta sensibilidade e especificidade, simplicidade, rapidez e baixo custo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi desenvolvido no laboratório de Retrovírus (RETROLAB) do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da UFMG sob o número de protocolo 101/09.

3.1. Coleta de material clínico

Foram utilizadas 150 amostras durante os experimentos: 78 amostras de sangue total, coletadas no período de 15/08/2009 à 14/07/2010, sem distinção de raça, sexo e idade, de gatos de proprietários particulares e abrigos da região metropolitana de Belo Horizonte – Minas Gerais por meio de punção da veia jugular, em dois tubos a vácuo um contendo EDTA para extração de DNA total e utilização na PCR; e outro sem anticoagulante para obtenção do soro. Setenta e duas amostras adicionais foram gentilmente doadas pelo Departamento de Clínica Veterinária da USP, SP, previamente testadas por SNA Combo Plus e pela PCR.

3.2. Controles

Como controle positivo foi utilizado uma amostra coletada de um animal positivo testado por SNAP Combo Plus, PCR e *Western blot*. O controle negativo foi uma amostra coletada de um animal negativo, comprovado a partir dos mesmos testes.

3.3. Teste ouro

Como teste ouro foi utilizado o kit comercial SNAP Combo Plus (IDEXX Laboratories Inc One Idexx Dr, Westbrook, USA) que apresenta uma sensibilidade de 100% e uma especificidade de 99,6% (Hartmann *et al.*, 2007).

3.4. Diagnóstico molecular

3.4.1. Extração do DNA total

O DNA foi extraído utilizando o kit NucleoSpin® Blood Columns (Macherey-nagel, Neumann-Neander, Düren, Alemanha), seguindo criteriosamente o protocolo e recomendações do fabricante.

Com o objetivo de estabelecer a mesma concentração de DNA para todas as amostras, as mesmas foram quantificadas no NanoVue Plus Spectrophotometer (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) utilizando-se uma alíquota de 2 µl e

posteriormente armazenadas a - 20 °C até a realização da PCR.

3.4.2. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Para a detecção do FIV foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores senso 5'-CTAGGAGGTGAGGAAGTTCA-3' e anti-senso 5'-CTGCTTGTTGTTCTTGAGTT-3', que amplificam um fragmento alvo de 244 pb, dentro da região codificadora do gene *gag* do FIV de acordo com Hohdatsu *et al.*, 1992.

O DNA total foi submetido à PCR de acordo com Hohdatsu *et al.* (1992), com algumas modificações, de acordo com o protocolo a seguir. As reações de PCR foram feitas em um volume final de 25 µl. Com exceção do DNA, todos os reagentes foram reunidos inicialmente em um mix contendo: tampão de PCR 10X sem MgCl₂, 3 mM de MgCl₂, 1 mM dNTP mix, 1 pmol iniciador senso, 1 pmol iniciador anti-senso, q.s.p 25 µl de H₂O SF (estéril filtrada) e 1 unidade de Platinum® Taq DNA Polymerase (5 U/ µl); que foi agitado suavemente e pipetado nos tubos. Cada tubo recebeu 23 µl do mix inicial e 2 µl de DNA. Todos os reagentes utilizados no mix foram da Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA.

As reações de PCR foram conduzidas no termociclador (PTC-100 (MJ Research Inc., Watertown MA, USA) com incubação inicial a 94 °C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos, cada um constituindo de desnaturação a 94 °C por 1 minuto, anelamento a 55 °C por 2 minutos, extensão da polimerase a 72 °C por 2 minutos e extensão final a 72 °C por 5 minutos.

Após os ciclos, os produtos amplificados foram visualizados em gel de poliacrilamida a 8% corado com nitrato de prata.

3.4.3. Eletroforese dos produtos da PCR

Utilizaram-se 2,7 ml de solução estoque de acrilamida 30%, 2 ml de tampão tris-acetato-EDTA (TAE 1X), 75 µl de persulfato de amônio 10%, 7,5 µl de

TEMED (BIO-RAD, RJ, Brasil) e água destilada (q.s.p). Foram utilizados 2 µl (100 ng) de marcador 50 pb DNA ladder (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), e 3 µl dos produtos da PCR diluídas em 1,5 µl de *gel loading buffer* (GLB - 0,5 ml de Glicerol, 50 µl de TAE 20X, 450 µl de H₂O, Azul de Bromofenol 1%). Após a corrida eletroforética em tampão TAE 1X/60 minutos/110 volts, o gel foi fixado por 10 minutos em etanol (10%), ácido acético (0,5%) e q.s.p. 100 ml de água destilada. Em seguida, impregnado por 10 minutos em nitrato de prata (0,1%). Lavou-se o gel em água destilada por 5 minutos e revelou-se o mesmo por 10 minutos em solução contendo hidróxido de sódio (3,6%), formol (0,3%) e q.s.p. 100 ml de água destilada.

O gel foi visualizado e fotografado em transiluminação por luz branca.

3.5. Indução e expressão do antígeno recombinante r-p24

3.5.1. Produção do antígeno recombinante (r-p24)

A proteína r-p24 foi desenvolvida por Mazur *et al.*, 2010. Para obtenção da r-p24 foi preparado um pré-inóculo em frasco de 50 ml contendo 10 ml de meio de cultura Luria Broth (LB) com ampicilina (Phoneutria, BH, MG, Brasil) a 100 µg/ml e raspas de gliceróis (aproximadamente 150 µl). O pré-inóculo foi incubado sob agitação por 18 horas a 37 °C e 250 (rpm). Em seguida, 500 ml de cultura LB, adicionado com ampicilina (100µg/ml), foram inoculados na proporção de 1:50 com o pré-inóculo.

Quando o cultivo alcançou uma densidade óptica (DO) entre 0,6 e 0,8 nm, coletou-se 1,0 ml da solução, centrifugou-se a 5600 xg por 5 minutos, preservando o *pellet* para posterior análise em gel de poliacrilamida dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), em seguida foi adicionado à cultura isopropyl β-D thiogalactoside (IPTG, Life Technologies, USA) a 1,0 mM. Após 4 horas adicionais de incubação, 1,0 ml da solução foi coletado, centrifugou-se a 5600 X g por 5 minutos, preservando o *pellet* para posterior análise em SDS-PAGE, centrifugando-se o restante

da cultura em 10 frascos de 50 ml a 2419 xg, por 15 minutos a 4 °C, que foram mantidos a - 80 °C, até a purificação da r-p24.

3.5.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE

Os produtos da indução foram fracionados por SDS-PAGE para permitir a identificação da expressão da r-p24, que possui um peso molecular de aproximadamente 30 KDa.

O gel de separação foi preparado a 12,5% em um volume final de 10 mL, utilizando-se 4,16 ml de solução estoque de acrilamida 30%, 2,5 ml de TRIS-HCL 1,5 M pH 8,8, 100 µl SDS 10%, 50 µl de persulfato de amônio 10%, 10 µl de TEMED (BIO-RAD, RJ, Brasil) e água destilada (q.s.p). O gel de concentração foi preparado a 5% em um volume final de 4 ml, utilizando-se 666 µl de solução estoque de acrilamida 30%, 1,0 ml de TRIS-HCL 0.5 M Ph 6.8, 40 µl SDS, 20 µl de persulfato de amônio 10%, 8 µl de TEMED (BIO-RAD, RJ, Brasil) e água destilada (q.s.p 4 mL). Foram utilizados 5 µl de marcador BenchMark™ Protein Ladder (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) e 5 µl dos produtos da indução diluídas em 5 µl de tampão de amostra 2X contendo 2-mercaptoetanol (Merck, Darmstadt, Germany). Após corrida eletroforética em tampão Tris-Glicina 1X por 70 minutos a 110 volts, o gel foi corado em solução azul de comassie (25% de metanol, 5% de ácido acético e 0.1% de azul brilhante de comassie G-250 (BIO-RAD, RJ, Brasil) por 20 minutos, que foi então

descorado utilizando-se uma solução de etanol (50%), ácido acético (10%) e q.s.p. 100 ml de água destilada. O gel foi visualizado e fotografado em transluminação por luz branca.

3.5.3. Purificação da proteína recombinante p-24 (r-p24)

Após a confirmação da expressão da r-p24 em SDS-PAGE, a purificação foi realizada em coluna com resina de quelato de níquel (His Trape FF, 1 ml, Amersham Biosciences Cor, Piscataway, USA). De acordo com o seguinte protocolo: um dos *pellets* foi ressuspenso em 6,0 ml de solução de lise (Tris 20 mM, EDTA 1 mM, Uréia 8 M, Imidazol 5 Mm, pH 8,0) e homogeneizado, com auxílio de um agitador. Para promover a lise bacteriana, a suspensão foi sonicada em gelo, utilizando-se o aparelho Vibra-Cell Ultrasonic Processor (Sonics e Materials, Newtown, USA) a 10 pulsos de 30 segundos com 40° de amplitude com intervalos de 1 minuto entre cada pulso. O lisado foi então, centrifugado a 2419,2 xg por 30 minutos a 4 °C; uma alíquota de 50 µl foi colhida para posterior análise em SDS-PAGE. Em seguida, a coluna foi equilibrada e empacotada utilizando-se a solução de lise.

Após a coluna ser equilibrada foram testados dois protocolos de lavagens (Quadros 1 e 2). Seguido a cada lavagem, o fluxo liberado foi coletado. E uma alíquota de todas as lavagens foi reservada para posterior análise em SDS-PAGE.

Quadro 1 - Resumo de lavagens do protocolo 1 de purificação de proteínas utilizado para obtenção da r-p24.

Soluções	Quantidade de lavagens	Volume
Tampão Salina Fosfatase (PBS) (NaCl (0.136 M, KCl (0.0027 M), Na ₂ HPO ₄ 12H ₂ O (0.008 M), KH ₂ PO ₄ (0.0147 M)) + 5 mM Imidazole	2X – para tirar o excesso de uréia e proteínas.	Apenas coletar fluxo liberado.
PBS + 40 mM Imidazol	2X	4 ml
PBS + 80 mM Imidazol	2X	4 ml
PBS + 120 mM Imidazole	2X	4 ml
PBS + 250 mM Imidazole	3X	4 ml
PBS + 1 M Imidazole	2X	4 ml

Quadro 2 - Resumo de lavagens do protocolo 2 de purificação de proteínas utilizado para obtenção da r-p24.

Soluções	Quantidade de lavagens	Volume
Tampão Salina Fosfatase (PBS) (NaCl (0.136 M, KCl (0.0027 M), Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O (0.008 M), KH ₂ PO ₄ (0.0147 M)) + 5 mM Imidazole	2X – para tirar o excesso de uréia e proteínas.	5 ml.
PBS + 40 mM Imidazole	2X	2 ml.
PBS + 250 mM Imidazole	2X	2 ml.
PBS + 1 M Imidazole	2X	2 ml.

A partir das análises das concentrações obtidas em cada partida de purificação da r-p24, utilizando o equipamento NanoVue Plus Spectrophotometer (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) foi selecionado o melhor protocolo.

3.6. Diagnóstico confirmatório e determinação da ocorrência do FIV na região metropolitana de BH

3.6.1. Western blot

Para validação da reatividade da r-p24 e diagnóstico confirmatório para determinação da ocorrência do FIV na região metropolitana de Belo Horizonte, foi empregado a técnica de *Western blot* de acordo com Egberink *et al.* (1991), com algumas modificações: os géis de separação foram preparados a 12,5% e 5% respectivamente, de acordo com o item 3.5.2.

Foram utilizados 5 µl de marcador BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) , e 3,14 µg/cm da r-p24 (0,095 µg/animal) diluídos em tampão de amostra 2X contendo 2-mercaptoetanol (Merck, Darmstadt, Germany). Após a corrida eletroforética em tampão Tris-Glicina 1X (Tris 25 mM, Glicina 0,25 mM, SDS 0.1% e água destilada q.s.p 1 L) por 70 minutos a 110 volts, foi realizada a transferência dos produtos do gel de poliacrilamida para uma membrana de nitrocelulose 0.45 µm HATF (Millipore Indústria e Comércio LTDA, SP, Brasil).

A transferência foi realizada em tampão de transferência 1X (Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,02%, metanol 20% e água destilada q.s.p 1 L), a 280 miliampères (mA) por 120 minutos. Após a transferência, a membrana de nitrocelulose foi cortada em tiras individuais com aproximadamente 5 mm de largura e colocadas em canaletas de incubação com um volume final de 250 µl, para iniciar a reação de *immunoblotting*. As tiras foram, então, submergidas com solução de bloqueio (TBS 1X - *Tris Buffered Saline* (Tris 20 mM, NaCl 150 mM, em água destilada q.s.p 1 L, pH 7,5 adicionado de 5% leite em pó desnatado) mais soro de gato nas diluições de 1: 10 e 1:100 por 1 hora, em temperatura ambiente, sob agitação. Em seguida foram realizadas 3 lavagens com TBS 1X + 0.05% Tween 20; foi adicionado o conjugado HRP Conjugated Goat anti-Cat IgG Fc (Immunology Consultants Lab, , Newberg, OR, USA) na diluição de 1:1000 deixando por 1 hora, em temperatura ambiente, sob agitação e 3 lavagens com TBS 1X + 0,05% Tween 20. A revelação foi realizado utilizando-se 250 µl DAB (Sigma Aldrich, VA, USA) de acordo com o protocolo do fabricante e a reação foi interrompida com água destilada. Em seguida as tiras foram visualizadas e fotografadas.

3.7. Padronização do r-p24 ELISA

3.7.1. Padronização do r-p24 ELISA

A técnica de ELISA indireto foi estabelecida de acordo com Reis (1997) com algumas alterações: inicialmente, as placas de ELISA (Maxsorb, Nunc, Hampton, NH, USA) foram adsorvidas com três diferentes concentrações do antígeno recombinante r-p24 (250 ng, 500 ng e 1 µg/poço) em tampão carbonato 0,015 M/bicarbonato 0,035 M pH 9.6), a 4 °C por 18 horas. Em seguida a placa foi lavada duas vezes (200 µl cada) com PBS 1X + Tween 20 (0,05%). Após as lavagens, foi realizado bloqueio dos sítios inespecíficos de ligação, incubando-se com PBS 1X adicionado de 5% leite em pó desnatado por 1 hora em temperatura ambiente. Novamente, foram realizadas duas lavagens (200 µl cada) com PBS + Tween 20 (0,05%). Em seguida diluições seriadas dos soros de dois animais, um positivo e um negativo (1:20 a 1:1280) foram realizadas em PBS 1 X adicionado de 2% leite em pó desnatado, e 100 µl de cada diluição, foram adicionados em cada poço da placa deixando por 1 hora em temperatura ambiente. Seguiu-se três lavagens com PBS 1 X + Tween 20 (0.05%), e foram testadas diluições seriadas entre 1:5000 e 1:7500 do conjugado (HRP Conjugated Goat anti-Cat IgG Fc (Immunology Consultants Lab, Newberg, OR, USA) em 100 µl de PBS 1 X adicionado de 2% leite em pó desnatado, em cada poço da placa, deixando reagir por 1 hora em temperatura ambiente. Três novas lavagens foram realizadas com PBS 1X + Tween 20 (0.05%) e foi adicionado em cada poço 100 µl do substrato para peroxidase (ácido cítrico 0.1 M, fosfato de sódio 0.2 M, H₂O₂ (30 volumes) (MERCK, Darmstadt, Germany) na diluição 1:1150 e 0.3 mg/ml de Orto-fenil-diamina (OPD) (Sigma Aldrich, VA, USA), incubando-se por 15 minutos. Seguindo este período a reação foi interrompida com 40 µl de H₂SO₄ (4 M) e foi realizada a leitura a 490 nm. Todos os soros foram avaliados em duplicata.

Após as análises foi estabelecida a utilização da diluição de 1: 320, 250 ng e 1:7500 das diluições do soro, concentração do antígeno e diluição do conjugado, respectivamente, para o diagnóstico indireto da infecção pelo FIV pela técnica de ELISA, visando o estabelecimento do diagnóstico de alta sensibilidade e especificidade.

Após padronização, todas as 150 amostras foram testadas nestas condições.

3.8. Análise estatística

Para análise estatística os dados foram tratados no programa Excel 2007 (Microsoft Corporation, USA) e as análises foram realizadas no programa STATA (Statistics Data Analysis Special Edition, StataCorpo, College Station, Texas, USA).

3.8.1. Definição do ponto de corte do r-p24 ELISA

O r-p24 ELISA foi comparado ao teste ouro (SNAP Combo Plus). Em seguida, foi realizada a análise da distribuição entre negativos e positivos ao ELISA, quando comparado ao teste ouro. Determinou-se o ponto de corte convencional e o equilíbrio entre especificidade e sensibilidade foi avaliado. Todos os dados foram verificados de acordo com o método "Tabela Contingência" – χ^2 (teste qui-quadrado) com nível de confiança a 95%. Os atributos intrínsecos do teste foram avaliados através da análise da sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN). Em seguida foi calculado o índice Kappa para análise da concordância entre os testes.

3.8.2. Estudo comparativo dos testes SNAP, r-p24 ELISA, PCR e *Western blot*

Considerando o SNAP como teste ouro, foram comparadas a sensibilidade, especificidade, VPP e VPN relativa dos testes PCR, r-p24 ELISA e *Western blot*; e foi calculado o índice Kappa para análise da concordância entre os mesmos (tabela 1).

3.8.3. Análise da ocorrência de FIV na região metropolitana de Belo Horizonte, Minas Gerais

Para análise da ocorrência foram utilizados os resultados obtidos a partir da PCR e do SNAP Combo Plus das 78 amostras coletadas na região metropolitana de BH, MG. Os resultados conflitantes foram confirmados através da técnica de *Western blot*. A análise estatística foi realizada a partir da tabela de contingência do χ^2 ($p < 0,05$).

4. RESULTADOS

4.1. Purificação da r-p24

A partir dos resultados obtidos em cada protocolo (Quadros 1 e 2), concluiu-se que o protocolo 2 apresentou melhor eficiência, proporcionando maiores concentrações da r-p24 (0,22 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) quando comparado à 0,082 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ obtido pelo protocolo do quadro 1.

4.2. Análise da reatividade da r-p24 através do *Western blot*

A r-p24 na concentração de 3,14 $\mu\text{g}/\text{cm}$ da r-p24 (0,095 $\mu\text{g}/\text{animal}$), mostrou-se reativa na técnica de *Western blot* quando utilizada em soros de gatos infectados pelo FIV nas diluições de 1:10 e 1:100 e conjugado na diluição de 1:1000 (fig. 1).



Figura 1 - Análise da reatividade da r-p24 através da técnica de *Western blot* utilizando-se soros de gatos infectados pelo FIV nas diluições de 1:10 e 1:100 e conjugado na diluição de 1:1000.

4.3. Padronização do r-p24 ELISA

4.3.1. Padronização e ponto de corte

O ELISA indireto foi padronizado com as seguintes condições: 2.5 ng/ml (250 ng da r-p24/poço), soro na diluição de 1:320 e conjugado na diluição de 1:7500. Nestas condições obteve-se uma maior discriminação entre soros positivos e negativos (150) baseado nos resultados do SNAP COMBO (IDEXX) teste ouro utilizado como referência nesta padronização (fig. 2).

A análise do ponto de corte convencional (fig. 3) e do ponto de corte através da curva ROC buscando o equilíbrio entre especificidade e sensibilidade (fig. 4) mostrou que não houve variação entre as análises. Devido à análise do ponto de corte com a curva ROC comparar o teste em todos os limiares de decisão considerados e não somente um par de sensibilidade e especificidade, o ponto de corte foi padronizado em 0,528.

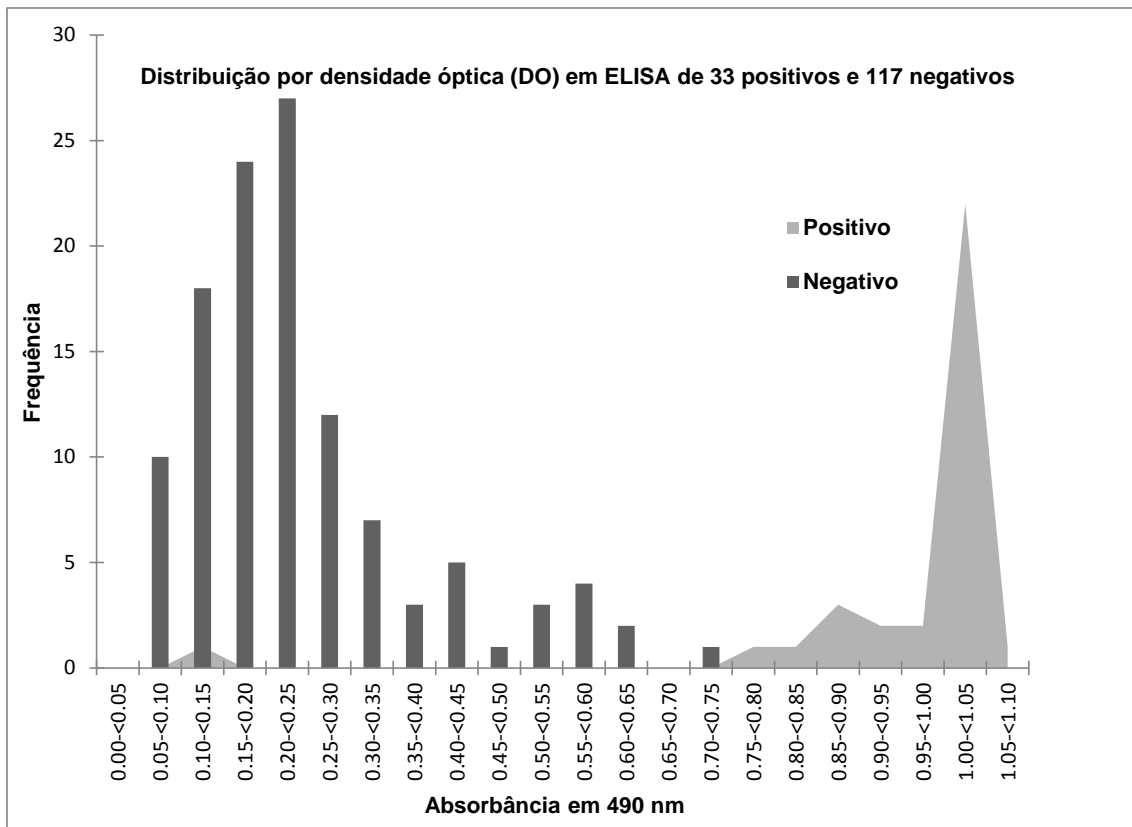


Figura 2 - Gráfico representando a distribuição por densidade óptica (DO) dos soros em r-p24 ELISA comparada ao SNAP Combo Plus (Idexx Laboratories Inc One Idexx Dr, Westbrook, USA).

SNAPcod	ELISCONVSNAP		Total
	0	1	
0	110	8	118
1	1	31	32
Total	111	39	150

obs	ROC Area	std. Err.	-Asymptotic Normal- [95% Conf. Interval]	
150	0.9505	0.0195	0.91231	0.98864

Figura 3 – Análise do ponto de corte convencional através da distribuição da densidade óptica (DO) dos soros em r-p24 ELISA comparada ao SNAP Combo Plus (Idexx Laboratories Inc One Idexx Dr, Westbrook, USA). 0 - Representa amostras negativas; e 1 - Representa amostras positivas.

SNAPcod	ELISSNAPP528		Total
	0	1	
0	110	8	118
1	1	31	32
Total	111	39	150

Obs	ROC Area	Std. Err.	—Asymptotic Normal— [95% Conf. Interval]	
150	0.9505	0.0195	0.91231	0.98864

Figura 4 - Análise do ponto de corte através da curva ROC buscando o equilíbrio entre especificidade e sensibilidade. SNAP x ELISA: ponto de corte 0,528. 0 - Representa amostras negativas; e 1 - Representa amostras positivas.

4.3.2. Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo

Avaliando os atributos intrínsecos do teste e utilizando o ponto de corte determinado o r-p24 ELISA apresentou uma sensibilidade de 97% e especificidade de 93% quando

comparado ao teste ouro. Ao avaliar a probabilidade de que um gato com resultado positivo e negativo no ELISA realmente possuía ou não anticorpos contra FIV, encontrou-se VPP = 79% e VPN = 99%. A concordância entre os dois testes foi de 0.83 no índice Kappa (fig. 4).

4.4. Análise comparativa entre os testes SNAP, r-p24 ELISA, Western blot e PCR

Tabela 1 - Análise comparativa entre os testes ELISA, Western blot e PCR quando comparados ao SNAP Combo Plus

ELISA								
SNAP Combo Plus	Negativo	Positivo	Total	Sens. %	Esp. %	Kappa	VPP %	VPN %
Negativo	110	8	118	97	93	0.8344	79	99
Positivo	1	31	32					
Total	111	39	150					

Western blot								
SNAP Combo Plus	Negativo	Positivo	Total	Sens. %	Esp. %	Kappa	VPP %	VPN %
Negativo	116	2	118	97	98	0.9411	94	99
Positivo	1	31	32					
Total	117	33	150					

PCR								
SNAP Combo Plus	Negativo	Positivo	Total	Sens. %	Esp. %	Kappa	VPP %	VPN %
Negativo	113	5	118	91	96	0.8446	85	97
Positivo	3	29	32					
Total	116	34	150					

Sen. = sensibilidade; Esp. = especificidade; VPP = valor preditivo positivo; VPN = valor preditivo negativo

Quando comparado o r-p24 ELISA com o *Western blot* foi encontrado uma sensibilidade de 94% e especificidade de 94% com índice Kappa de 0.84.

Entretanto, 17 amostras apresentaram resultados conflitantes aos testes realizados (tabela 2).

Tabela 2 - Amostras com resultados divergentes nos testes PCR, SNAP Combo Plus, *Western blot* e ELISA.

AMOSTRA	PCR	SNAP Combo Plus	<i>Western blot</i>	ELISA
3	POS	NEG	POS	NEG
5	NEG	NEG	POS	NEG
6	POS	NEG	NEG	NEG
8	POS	NEG	NEG	NEG
10	NEG	P	POS	POS
13	POS	NEG	NEG	NEG
14	POS	NEG	NEG	NEG
35	NEG	POS	POS	POS
37	NEG	POS	NEG	NEG
55	NEG	NEG	NEG	POS
114	NEG	NEG	NEG	POS
129	NEG	NEG	NEG	POS
134	NEG	NEG	NEG	POS
135	NEG	NEG	NEG	POS
137	NEG	NEG	NEG	POS
140	NEG	NEG	NEG	POS
147	NEG	NEG	NEG	POS

NEG. = negativo; POS. = positivo.

4.5. Ocorrência de FIV na região metropolitana de Belo Horizonte, Minas Gerais

A tabela de contigência (tabela 3) demonstra a distribuição dos animais infectados por FIV por gênero. Não houve diferenças estatísticas significantes a partir

do teste χ^2 para a infecção entre machos e fêmeas ($p < 0.05$).

Todos os animais infectados eram assintomáticos e possuíam mais de 1 ano de idade. Dos animais infectados, apenas um apresentou-se também positivo para FeLV no teste SNAP Combo Plus.

Tabela 3 - Ocorrência do vírus da imunodeficiência felina na região metropolitana de Belo Horizonte, MG.

	Fêmeas	Machos	Total
Positivo	0 (0.0%)	3 (3.85%)	3 (3.85%)
Negativo	37 (47.44%)	38 (48.71%)	75 (96.15%)
Total	37 (47.44%)	41 (52.56%)	78 (100%)

5. DISCUSSÃO

Os testes para o diagnóstico do FIV baseiam-se na detecção de anticorpos que reconhecem proteínas estruturais do vírus como a p24, a p15 e uma das glicoproteínas do envelope viral, a gp40 (Teixeira *et al.*, 2010; Rosati *et al.*, 2004). Alguns autores descreveram a utilização de antígenos recombinantes em testes imunoenzimáticos altamente sensíveis e específicos para o diagnóstico do FIV (Calzolari *et al.*, 2005, Avrameas *et al.*, 1993; Rosati *et al.*, 2004).

No presente estudo, o ELISA indireto padronizado utilizando o antígeno recombinante r-p24, apresentou sensibilidade de 97%, especificidade de 93% e índice Kappa de 0.83 quando comparado ao teste ouro SNAP Combo Plus. O SNAP Combo Plus é um teste comercial imunocromatográfico sensibilizado com os antígenos recombinantes p24 e gp40 do FIV e anticorpo monoclonal anti a proteína p27 do FeLV o que justifica sua alta sensibilidade e especificidade (Hartmann *et al.*, 2007).

O SNAP é um teste qualitativo e a vantagem da técnica de ELISA em placa sobre ele é a possibilidade da análise da absorbância de amostras individuais, e aquelas que apresentarem perfil duvidoso podem ser confirmadas através de um teste mais específico.

O ponto de corte do r-p24 ELISA padronizado foi calculado de acordo com a curva ROC, a qual compara o teste em todos os limiares de decisão considerados. Xu *et al.* (1997) também obtiveram maior sensibilidade e especificidade do teste utilizando este método. De acordo com os mesmos autores, a decisão do ponto de corte depende da finalidade do teste. Em FIV o maior risco é deixar que gatos positivos assintomáticos sejam veiculadores do vírus, contudo é necessário testes de diagnóstico que apresentem maior sensibilidade, sendo a confirmação quando necessária, realizada pelo *Western blot* (Mortola *et al.*, 2004; Hosie *et al.*, 2009). O r-

p24 ELISA, apresentou alta sensibilidade e uma boa especificidade, bons valores preditivos negativos e positivos, entretanto, não foi possível definir bem uma área de indefinidos, devido à linearidade das amostras.

Kashiwase *et al.* (1997) demonstraram durante a padronização de um ELISA de captura utilizando anticorpo monoclonal *in vitro* que a proteína p24 recombinante apresenta alta reatividade em testes sorológicos como o ELISA e o *Western blot*. Os mesmos autores encontraram uma boa linearidade em seus resultados e um limite de detecção de 40 pg/ml, o que provavelmente está relacionado à utilização de anticorpo monoclonal. Calzolari *et al.* (1995) utilizando antígenos recombinantes de superfície (SU), transmembrana (TM) e capsídeo (CA), descreveram testes ELISA indiretos para o diagnóstico do FIV e encontraram uma sensibilidade de 63% e especificidade de 100%, o que difere do r-p24 ELISA, que apresentou maior sensibilidade ao diagnóstico do FIV. Entretanto, teste padronizado neste estudo apresentou sensibilidade semelhante ao ELISA padronizado por Calzolari *et al.* (1995) utilizando a proteína recombinante TM, que apresentou uma sensibilidade de 98% e uma especificidade de 97%. Vários autores já demonstraram em retrovírus que proteínas transmembranas apresentam maior imunogenicidade que as proteínas do capsídeo (Chong *et al.*, 1991; Fontenot *et al.*, 1992). Entretanto, CA é a proteína majoritária do core viral, altamente conservada e não glicosilada. Estes fatores indicam CA como uma das proteínas de eleição para uso na prova de ELISA (Calzolari *et al.*, 1995; Mermer *et al.*, 1992; Reid *et al.*, 1991). Rosati *et al.* (2004) demonstraram que a utilização de ambos antígenos recombinantes (CA e TM) em um único teste de diagnóstico aumentam a sensibilidade do mesmo. Hartmann *et al.* (2007) compararam diversos testes comerciais de diagnóstico para o FIV e demonstram que os testes que utilizam antígenos recombinantes CA e TM apresentam maior sensibilidade e

especificidade. Avrameas *et al.* (1993) utilizando peptídios sintéticos para as proteínas SU e TM (P237) detectaram através do ELISA 100% dos animais infectados, demonstrando que a utilização de antígenos sintéticos também são importantes ferramentas no diagnóstico do FIV.

Hosie e Jarret (1990) através de seus estudos relataram que testes sorológicos podem gerar resultados falsos positivos devido à sua baixa especificidade. Portanto, o diagnóstico deve ser associado ao diagnóstico clínico e ao estilo de vida do animal. Animais positivos com baixo risco de infecção devem ter seus testes confirmados através de um método mais específico (Teixeira *et al.*, 2010). Resultados falsos negativos podem ser encontrados na fase terminal da doença, devido à imunossupressão característica dos animais infectados (Teixeira *et al.*, 2010). Mortola *et al.* (2004) relata que para diminuir o risco de infecção de animais não infectados é necessária a utilização de testes de diagnósticos altamente sensíveis. Entretanto, quando houver dúvidas quanto ao resultado deve-se fazer um teste mais específico, como, por exemplo, o *Western blot* (Hosie *et al.*, 2009).

No presente estudo o *Western blot* apresentou uma sensibilidade de 97% e uma especificidade de 98% quando comparado ao SNAP Combo Plus (Kappa 0,94), apresentando uma maior especificidade em relação ao r-p24 ELISA e a PCR que apresentou uma sensibilidade de 91% e uma especificidade de 94%, o que confirma que o *Western blot* é o melhor teste confirmatório para o diagnóstico do FIV. Alvarez *et al.* (2007) e Thorn *et al.* (1987) também demonstraram que o *Western blot* é um bom teste confirmatório para o vírus da anemia infecciosa equina (EIAV) e para o HIV. Contudo, o r-p24 ELISA quando comparado ao *Western blot* apresentou um índice Kappa de 0.84.

Alguns autores relataram variações nos resultados obtidos a partir de testes sorológicos e moleculares (Bienzle *et al.*, 2004; Mortola *et al.*, 2004; Teixeira *et al.*,

2010) neste estudo também foi observado divergências entre resultados dos testes realizados (tabela 2). A PCR pode apresentar resultados duvidosos, devido à acentuada variabilidade genética do FIV, iniciadores específicos para apenas um subtipo, baixa carga viral durante um período prolongado de infecção, falhas nos processos de extração de DNA e/ou RNA e por preparações inadequadas dos componentes de PCR (Caxito, 2003; Bachmann *et al.*, 1997; Pedersen *et al.*, 1989; Bienzle *et al.*, 2004). Neste estudo foi possível verificar variações entre o r-p24 ELISA e a PCR (Kappa 0.76). Para utilização da técnica de PCR são necessários profissionais bem treinados e uma boa padronização da técnica. E também, são necessários mais estudos para verificar possíveis variações nucleotídicas e até mesmo possíveis novos subtipos do FIV no Brasil para garantir uma melhor padronização e acurácia do diagnóstico molecular.

Ao avaliar a ocorrência de FIV na região metropolitana de BH foi encontrada uma ocorrência de 3,85% para FIV e 17,95% para a infecção pelo FeLV na região metropolitana de Belo Horizonte. Estes resultados foram diferentes dos resultados encontrados para FIV em São Paulo (14,7%) (Lara *et al.* 2008), Rio Grande do Sul (37,5%) (Caldas *et al.*, 2000), Rio de Janeiro (20,2%) (Souza *et al.*, 2002), e Minas Gerais (2,7% e 9,43%) (Caxito, 2003; Alves *et al.*, 2010). Os resultados encontrados para FeLV foram semelhantes aos encontrados em diferentes estados brasileiros. Reche *et al.* (1997) e Souza *et al.* (2002) encontraram 8% e 17% dos gatos positivos para FeLV em São Paulo e Rio de Janeiro, respectivamente. A taxa de infecção pelo FIV de 3.85% encontrado em nosso estudo em animais assintomáticos difere da taxa de 1,47% encontrada por Caxito *et al.* (2006), em animais sadios no mesmo estado, Minas Gerais. Os autores também encontraram uma taxa de infecção de 13,95% nos gatos doentes, o que confirma uma maior susceptibilidade dos animais doentes infectados pelo FIV (Hosie *et al.*, 1989; Ishida *et al.* 1989). Caxito *et al.* (2006) em Minas Gerais e Lara *et al.* (2008),

em São Paulo também mostraram que a infecção pelo FIV foi mais prevalente no sexo masculino (4,38% e 20,3%) do que em gatos do sexo feminino (0,90% e 9,7%), respectivamente. No entanto, neste estudo, a taxa de infecção de FIV e FeLV em machos e fêmeas não apresentou diferença estatística, provavelmente, devido ao pequeno número amostral. Para uma melhor análise seria necessário testar um número maior de amostras. Estes resultados são semelhantes aos encontrados por Souza *et al.* (2002) no Rio de Janeiro e Teixeira *et al.* (2007) em Belo Horizonte.

A taxa de infecção de FIV e FeLV encontrada no presente estudo em gatos de abrigos foi inferior à taxa de 4,14% e 32,5% encontrados por Teixeira *et al.* (2007) em Belo Horizonte. No entanto, estes resultados estão em conformidade com os resultados encontrados por Caxito *et al.* (2006), no qual os gatos de abrigos (3,05%) tinham uma maior porcentagem da infecção pelo FIV quando comparado aos gatos de rua (1,11%) e Lara *et al.* (2008) que encontrou uma prevalência de 23,1% em gatos de abrigos e 5,9% em gatos de rua. As altas taxas de infecção por estes vírus estão associadas a gatos com acesso a rua, que normalmente possuem comportamento mais agressivo (Lutz *et al.*, 1990; Bandecchi *et al.* 1992; Ishida *et al.* 1989; Hosie *et al.* 1989; Braley 1994). Neste estudo, 3,85% e 14,10% dos gatos infectados por FIV e FeLV, respectivamente possuíam mais de um ano de idade. Hosie *et al.* (1989), mostraram que a infecção ocorre mais comumente após o primeiro ano de idade e sua prevalência é maior em gatos idosos. Estudos sorológicos mostraram a presença de anticorpos anti-FIV em São Paulo (20,5%) (Reche *et al.* 1997) e Rio de Janeiro (16,7% e 21,0%) (Almeida *et al.* 2004; Souza *et al.* 2002). Estas taxas de ocorrência são elevadas se comparadas à do presente estudo, provavelmente porque alguns métodos sorológicos são menos específicos e podem gerar resultados falso-positivos, de acordo com Hosie e Jarret (1990). Contudo, a obtenção de um diagnóstico confiável é importante porque o

FIV é transmissível e infeccioso e ocasiona uma doença incurável.

Testes sorológicos possuem suas limitações, de modo que a confirmação dos resultados positivos no ELISA por *Western blot* é recomendada (Hosie *et al.*, 2009). Estudos epidemiológicos da infecção pelo FIV e FeLV são essenciais para a prevenção da disseminação do vírus em gatos domésticos. O diagnóstico precoce da infecção pelo FIV e FeLV é a principal forma de prevenção, já que os animais imunodeprimidos são susceptíveis à infecções por outros patógenos (Lucas *et al.* 1998; O'Neil *et al.* 1991), tais como *Toxoplasma gondii* (Witt *et al.*, 1989) ou *Cryptococcus neoformans* (Malik *et al.*, 1992) dentre outros, e podem atuar como veiculadores destes patógenos para o homem.

6. - CONCLUSÕES

A r-p24 produzida apresentou alta reatividade aos testes *Western blot* e ELISA, apresentando sensibilidade e especificidade similar aos testes que utilizam os antígenos recombinantes CA e TM associados.

A partir da análise dos dados foi possível verificar que o ELISA indireto utilizando o antígeno recombinante r-p24 apresentou uma alta sensibilidade e boa especificidade para o diagnóstico do FIV. Entretanto, dados conflitantes devem ser confirmados em *Western blot* que apresenta maior especificidade.

O teste padronizado é uma importante ferramenta para as pesquisas relacionadas e ao diagnóstico do FIV, já que foi desenvolvido a partir de tecnologia nacional e tende a ser mais em conta que os kits importados.

7. – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, F. M.; FARIA, M. C. F.; BRANCO, A. S. *et al.* Sanitary conditions of colony of urban feral cats (*Felis catus* Linnaeus, 1758) in a Zoological Garden of Rio de Janeiro, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop.*, v. 46, n. 5, p. 269-274, 2004.
- ALVAREZ, I.; GUTIERREZ, G.; OSTLUND, E. *et al.* Western blot Assay Using Recombinant p26 Antigen for Detection of Equine Infectious Anemia Virus-Specific Antibodies. *Clin. and vac. Immun.*, v. 14, n. 12, p.1646-648, 2007.
- ALVES, F.; RAJÃO, D. S.; DEL PUERTO, H. L. *et al.* In: XXII Congresso Panamericano de Ciencias Veterinarias, 22., 2010. Lima. Anais XXII Congresso panamericano de Ciências Veterinárias: 2010. p. 35.
- AVRAMEAS, A.; STROSBURG, A. D.; MORAILLON, A. *et al.* Serological diagnosis of feline immunodeficiency virus infection based on synthetic peptides from Env glycoproteins. *Res. Virol.*, v. 144, n. 3. p. 209-218, 1993.
- 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. *et al.* 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.
- BARLOUGH, J. E.; ACKLEY, C. D.; GEORGE, J. W. *et al.* Acquired immune dysfunction in cats with experimentally induced feline immunodeficiency virus infection: comparison of short-term and long-term infections. *J. Acquir. Immun. Defic. Syndr.*, v. 4, n. 3, p. 219-27, 1991.
- BENDINELLI, M.; PISTELLO, M.; LOMBARD, S. *et al.* 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. *et al.* 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. *Fel. Pract.*, v. 22, n. 2, p. 25-28, 1994.
- CALDAS, A. P. F.; LEAL, E. S.; SILVA, E. F. A. *et al.* Detecção do provírus da imunodeficiência felina em gatos domésticos pela técnica de reação em cadeia da polimerase. *Pesq. Vet. Bras.*, 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.
- CALZOLARI, M.; YOUNG, E.; COX, D. *et al.* Serological diagnosis of feline immunodeficiency virus infection using recombinant transmembrane glycoprotein. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 46, n. 1-2, p. 83-92, 1995.
- CAXITO, F. A. *Detecção de subtipagem do vírus da imunodeficiência felina em Minas Gerais.* 2003. 90 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biológicas. Universidade Federal de Minas Gerais, MG.
- CAXITO, F. A.; COELHO, F. M.; OLIVEIRA, M. E. *et al.* Phylogenetic analysis of feline immunodeficiency virus strain from State of Minas Gerais, Brazil. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 58, n. 6, p. 1222-1225, 2006.

- CHONG, Y. H.; BALL, J. M.; ISSEL, C. J. *et al.* Analysis of equine humoral immune responses to the transmembrane envelope glycoprotein (gp 45) of equine infectious anemia virus. *J. Virol.*, v. 65, n. 2, p. 1013-1018, 1991.
- DANDEKAR, S.; BEEBE, A. M.; BARLOUGH, J. *et al.* Detection of feline immunodeficiency virus (FIV) nucleic acids in FIV-seronegative cats. *J. Virol.*, v. 66, n. 7, p. 4040-9, 1992.
- DOW, S. W.; DREITZ, M. J.; HOOVER, E. A. Feline immunodeficiency virus neurotropism: evidence that astrocytes and microglia are the primary target cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 35, n. 1-2, p. 23-35, 1992.
- DUARTE, A.; TAVARES, L. Phylogenetic analysis of Portuguese feline immunodeficiency virus sequences reveals high genetic diversity. *Vet. Microbiol.*, v. 114, n.1-2, p. 25-33, 2005.
- EGBERINK, H. F.; LUTZ, H.; HORZINEK, M. C. Use of *Western blot* and radioimmunoprecipitation for diagnosis of feline leukemia and feline immunodeficiency virus infections. *J Am Vet Med Assoc.*, v. 199, n. 10, p. 1339-42, 1991.
- FONTENOT, J. D.; HOOVER, E. A.; ELDER, J. E. *et al.* 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.
- FUCHS, A.; BINZEL, L.; LONSDORFER, M. Epidemiology of FeLV and FIV Infection in the Federal Republic of Germany. *Tieraerztl.Prax.*, v. 22, n. 3, p. 273-277, 1994.
- HARTMANN, K. Feline immunodeficiency virus infection: an overview. *Vet. J.*, v. 155, n. 2, p. 123-137, 1998.
- HARTMANN, K.; GRIESSMAYR, P.; SCHULZ, B. *et al.* Quality of different in-clinic test systems for feline immunodeficiency virus and feline leukaemia virus infection. *J. Fel. Med. Surg.*, v. 9, n. 6, p. 439-45, 2007.
- HAYWARD, J. J.; TAYLOR, J.; RODRIGO, A. G. Phylogenetic analysis of feline immunodeficiency virus in feral and companion domestic cats of New Zealand. *J. of Virol.*, v. 81, n. 6, p. 2999-3004, 2007.
- HOHDATSU, T.; YAMADA, M.; OKADA, M. *et al.* 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.
- HOHDATSU, T.; MOTOKAWA, K.; USAMI, M. *et al.* Genetic subtyping and epidemiological study of feline immunodeficiency virus by nested polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of the *gag* gene. *J. Virol. Methods.*, v. 70, n. 1, p. 107-11, 1998.
- 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.
- 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.; ADDIE, D.; BELÁK, S. *et al.* Feline Immunodeficiency: ABCD guidelines on prevention and management. *Jour. of Fel. Med. and Surg.*, v. 11, n. 7, p. 575-584, 2009.
- ISHIDA, T.; WASHIZU, T.; TORIYABE, K. *et al.* Feline immunodeficiency virus in cats of Japan. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 194, n. 2, p. 221-225, 1989.

- KASHIWASE, H.; ISHIMURA, M.; ISHIKAWA, Y. *et al.* Characterization of one monoclonal antibody against feline immunodeficiency virus p24 and its application to antigen capture ELISA. *J. Virol. Methods.*, v. 68, n. 2, p. 183-92, 1997.
- KUROSAWA, K.; IKEDA, Y.; MIYAZAWA, T. *et al.* Development of restriction fragment-length polymorphism method to differentiate five subtypes of feline immunodeficiency virus. *Microbiol. Immunol.*, v. 43, n. 8, p. 817-20, 1999.
- KUSUHARA, H.; HOHDATSU, T.; SETA, T. *et al.* Serological differentiation of FIV-infected cats from dual-subtype feline immunodeficiency virus vaccine (Fel-O-Vax FIV) inoculated cats. *Vet. Microbiol.*, v. 120, n. 3-4, p. 217-25, 2007.
- LARA, V. M.; TANIWAKI, S. A.; ARAÚJO, JR. J. P. Caracterização filogenética de amostras do vírus da imunodeficiência felina (FIV) do Estado de São Paulo. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 27, n. 11, p. 467-470, 2007.
- LARA, V. M.; TANIWAKI, S. A.; ARAÚJO JÚNIOR, J. P. Occurrence of feline immunodeficiency virus infection in cats. *Cienc. Rural.*, v. 38, n. 8, p. 2245-2249, 2008.
- LEVY, J. K.; CRAWFORD, P. C.; KUSUHARA, H. *et al.* Differentiation of feline immunodeficiency virus vaccination, infection, or vaccination and infection in cats. *J. Vet. Intern. Med.*, v. 22, n. 2, p. 330-4, 2008.
- LOMBARDI, S.; GARZELLI, C.; LA ROSA, C. *et al.* 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. *et al.* 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.
- LUTZ, H.; LEHMANN, R.; WINKLER, G. *et al.* Feline immunodeficiency virus in Switzerland: clinical aspects and epidemiology in comparison with feline leukemia virus and coronaviruses. *Schweiz Arch Tierheilkd.*, v. 132, n. 5, p. 217-25, 1990.
- MAZUR, C.; REIS, J. K. P.; LEITE, R. C. *et al.* Evaluation of a recombinant p24 antigen for the detection of feline immunodeficiency virus-specific antibodies. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 30, n. 10, p. 877-880, 2010.
- MALIK, R.; WIGNEY, D. I.; MUIR, D. B. *et al.* 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.
- MEEKER, R. B.; AZUMA, Y.; BRAGG, D. C. *et al.* Microglial proliferation in cortical neural cultures exposed to feline immunodeficiency virus. *J. Neuroimmunol.*, v. 101, n. 1, p. 15-26, 1999.
- MERMER, B.; HILLMAN, P.; HARRIS, R. *et al.* A recombinant-based feline immunodeficiency virus antibody enzyme-linked immunosorbent assay. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 35, n. 1-2, p. 133-41, 1992.
- MORTOLA, E.; OLIVA, G.; RISSO, M. *et al.* Feline immunodeficiency virus infection: a comparative study of different diagnostic techniques. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 56, n. 1, p. 13-18, 2004.
- O'NEIL, S. A.; LAPPIN, M. R.; REIF, J. S. *et al.* Clinical and epidemiological aspects of feline immunodeficiency virus and *Toxoplasma gondii* coinfection in cats. *Jour. of the Amer. An. Hosp. Assoc.*, v. 27, n. 2, p. 211-20, 1991.
- O'NEIL, L. L.; BURKHARD, M. J.; DIEHL, L. J. *et al.* Vertical transmission of feline immunodeficiency virus. *Semin. Vet. Med. Surg. (Small Anim.)*, v. 10, n. 4, p. 266-78, 1995.

- PANCINO, G.; CHAPPEY, C.; SAURIN, W. *et al.* Epitopes and selection pressures in feline immunodeficiency virus envelope glycoproteins. *J. Virol.*, v. 67, n. 2, p. 664-672, 1993.
- PAILLOT, R.; RICHARD, S.; BLOAS, F. *et al.* Toward a detailed characterization of feline immunodeficiency virus-specific T cell immune responses and mediated immune disorders. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 106, n. 1-2, p. 1-14, 2005.
- PEDERSEN, N. C.; HO, E. W.; BROWN, M. L. *et al.* Isolation of a T-lymphotropic virus from domestic cats with an immunodeficiency-like syndrome. *Science.*, v. 235, n. 4790, p. 790-793, 1987.
- PEDERSEN, N. C.; YAMAMOTO, J. K.; ISHIDA, T. *et al.* Feline immunodeficiency virus infection. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 21, n. 1, p.111-129, 1989.
- PU, R.; COLEMAN, J.; COISMAN, J. *et al.* Dual-subtype FIV vaccine (Fel-O-Vax FIV) protection against a heterologous subtype B FIV isolate. *J. Fel. Med. Surg.* v. 7, n. 1, p. 65-70, 2005.
- RAVAZZOLLO, A. P.; COSTA, U. Retroviridae. In: FLORES, E. F. (Org.). *Virologia Veterinária*. Rio Grande do Sul: UFSM, 2007. Cap. 31, p. 809-838.
- RECHE, J. R. A.; HAGIWARA, M. K.; LUCAS, S. R. R. Clinical study of acquired immunodeficiency syndrome in domestic cats in São Paulo. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, v. 34, p. 152-155, 1997.
- REID, G.; RIGBY, M. A.; MCDONALD, M. *et al.* Immunodiagnosis of feline immunodeficiency virus infection using recombinant viral p17 and p24. *AIDS*. v. 5, n. 12, p. 1477-83, 1991.
- REIS, J. K. P. *Produção de antígenos recombinantes GP90 e P26 do vírus da Anemia Infecciosa Equina para uso em imunodiagnóstico*. 1997. 184f. Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- RIMSTAD, E.; UELAND, K. Detección of feline immunodeficiency virus by a nested polymerase chain reaction. *J. Virol. Meth.* v. 36, n. 3, p. 239-248, 1992.
- ROSATI, S.; PROFITI, M.; LORENZETTI, R. *et al.* Development of recombinant capsid antigen/transmembrane epitope fusion proteins for serological diagnosis of animal lentivirus infections. *Jour.of Virol. Meth.*, v. 121, n.1, p. 73–78, 2004.
- 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. *Clin.*, 36, 14-21, 2002.
- TEIXEIRA, B. M.; RAJÃO, D. S.; HADDAD, J. P. A. *et al.* Ocorrência do vírus da imunodeficiência felina e do vírus da leucemia felina em gatos domésticos mantidos em abrigos no município de Belo Horizonte. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 59, n. 4, p. 939-942, 2007.
- TEIXEIRA, B. M.; JUNIOR, A. R.; HAGIWARA, M. K. Vírus da imunodeficiência felina – uma atualização. *Clín. Vet.*, v. 88, p. 54-66, 2010.
- THORN, R. M.; BELTZ, G. A.; HUNG, C. H. *et al.* Enzyme immunoassay using a novel recombinant polypeptide to detect human immunodeficiency virus env antibody. *J. Clin. Microbiol.* v. 25, n. 7, p. 1207-12, 1987.

UENO H., T. HOHDATSU, Y. MURAMATSU, H. *et al.* Does coinfection of *Bartonella henselae* and FIV induce clinical disorders in cats? *Microbiol. Immunol.*, v. 40, n. 9, p. 617-620, 1996.

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.

XU, HUI; LOHR, JURGEN; GREINER, MATTHIAS. The selection of ELISA cut-off points for testing antibody to Newcastle disease by two-graph receiver operating characteristic (TG-ROC) analysis. *Jour. of Immun. Meth.*, v. 208, n. 1, p.61-64, 1997.

WEAVER, E. A.; COLLISSON, E. W.; SLATER, M. *et al.* Phylogenetic analysis of Texas isolates indicate an evolving subtype of the clade B feline immunodeficiency virus. *Journal of Virology*, v. 78, n. 4, p. 2158-2163, 2004.

WITT, C. J.; MOENCH, T. R.; GITTELSON, A. M. *et al.* Epidemiologic observations on feline immunodeficiency virus and *Toxoplasma gondii* coinfection in cats in Baltimore, Md. *Jour. of the Amer. Vet. Med. Assoc.*, v. 194, n. 2, p. 229- 33, 1989.

YAMAMOTO, J. K.; HANSEN, H.; HO, E. W. *et al.* 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.; PU, R.; Sato, E. *et al.* Feline immunodeficiency virus pathogenesis and development of a dual-subtype feline-immunodeficiency-virus vaccine. *AIDS*. v. 21, n. 5, p. 547-63, 2007.