

**UFRRJ**  
**INSTITUTO DE VETERINÁRIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA**  
**VETERINÁRIA**

**TESE**

**Quantificação de DNA pró-viral do vírus da Leucemia felina e  
avaliação clínica de gatos domésticos mantidos em abrigo.**

**Carla Regina Gomes Rodrigues Santos**

**2023**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO**  
**INSTITUTO DE VETERINÁRIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA**  
**VETERINÁRIA**  
**(PATOLOGIA E CIÊNCIAS CLÍNICAS)**

Quantificação de DNA pró-viral do vírus da Leucemia felina e avaliação  
clínica de gatos domésticos mantidos em abrigo.

Carla Regina Gomes Rodrigues Santos

Sob a Orientação da Professora

Heloisa Justen Moreira de Souza

Tese submetida como requisito  
parcial para obtenção do grau de  
Doutor em Medicina Veterinária  
(Patologia e Ciências Clínicas),  
área de concentração em Ciências  
Clínicas.

Seropédica, RJ

Março 2023

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S237q Santos, Carla Regina Gomes Rodrigues , 1982-  
Quantificação de DNA pró-viral do vírus da Leucemia  
Felina e avaliação clínica de gatos domésticos mantidos  
em abrigo. / Carla Regina Gomes Rodrigues Santos. -  
Seropédica, 2023.  
90 f.: il.

Orientadora: Heloisa Justen Moreira Souza.  
Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do Rio  
de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Medicina  
Veterinária da Universidade Federal Rural do rio de  
Janeiro, 2023.

1. DNA pró-viral, gatos, retrovíroses. I. Souza,  
Heloisa Justen Moreira, 18/11/1962-, orient. II  
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.  
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da  
Universidade Federal Rural do rio de Janeiro III.  
Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**CARLA REGINA GOMES RODRIGUES SANTOS**

Tese submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Doutora em Medicina Veterinária**, no Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária (Patologia e Ciências Clínicas), Área de Concentração em Ciências Clínicas.

TESE APROVADA EM 16/03/2023

---

Heloísa Justen Moreira de Souza. Dra. UFRRJ  
(Orientadora)

---

Cristiane Divan Baldani. Dra. UFRRJ

---

Julio Israel Fernandes. Dr. UFRRJ

---

Flavya Mendes de Almeida. Dra. UFF

---

Maria Cristina Nobre e Castro. Dra. UFF



Emitido em 2023

**TERMO Nº 725/2023 - PPGMV (12.28.01.00.00.00.51)**

**(Nº do Protocolo: NÃO PROTOCOLADO)**

*(Assinado digitalmente em 25/06/2023 19:53 )*

CRISTIANE DIVAN BALDANI  
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR  
DeptMCV (12.28.01.00.00.00.53)  
Matrícula: ###724#0

*(Assinado digitalmente em 23/06/2023 14:53 )*

HELOISA JUSTEN MOREIRA DE SOUZA  
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR  
DeptMCV (12.28.01.00.00.00.53)  
Matrícula: ###69#8

*(Assinado digitalmente em 26/06/2023 13:45 )*

JULIO ISRAEL FERNANDES  
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR  
PPGMV (12.28.01.00.00.00.51)  
Matrícula: ###634#0

*(Assinado digitalmente em 23/06/2023 15:33 )*

FLAVYA MENDES DE ALMEIDA  
ASSINANTE EXTERNO  
CPF: ###.###.567-##

*(Assinado digitalmente em 23/06/2023 15:06 )*

MARIA CRISTINA NOBRE E CASTRO  
ASSINANTE EXTERNO  
CPF: ###.###.077-##

Visualize o documento original em <https://sipac.ufrj.br/documentos/> informando seu número: **725**, ano: **2023**, tipo: **TERMO**, data de emissão: **23/06/2023** e o código de verificação: **48070699a2**

## **DEDICATÓRIA**

Dedico esta tese,

A todos os gatos da “ONG oito vidas”, amor eterno a todos.

A todos os professores que me inspiraram à docência desde minha graduação. Em especial as professoras Maria Cristina Nobre e Castro, Ana Maria Barros Soares e a Heloisa Justen Moreira de Souza.

Aos meus alunos que me inspiram e me ensinam a amar cada vez mais ser professora.

Aos meus pais, meus filhos, meu esposo e a minha madrinha por me dar todo amor do mundo.

E a Deus pelo dom da vida, a felicidade de passar por este momento é indescritível.

## **AGRADECIMENTOS**

A equipe de Médicas Veterinárias e amigas, Grazielle Moraes, Rayssa Mariane e Isabela Torres que ficaram ao meu lado todo o tempo, e colaboraram para que desse certo.

A Lilian Queiros que me permitiu entrar na “ONG oito vidas” para realizar este projeto que tanto contribuiu para os gatinhos residentes lá.

A Grazielle Moraes, meus olhos dentro do abrigo. Obrigada por tudo!!

Aos meus estagiários e alunos queridos Pedro Figueiredo, Alessandra e Renata que me ajudaram durante todo esse período

A Julia Santi, minha parceirinha, meu muito obrigada. Da Medicina Felina para vida.

A minha mãe científica e incentivadora Heloisa Justen. Sem você isso tudo aqui jamais aconteceria. Eterna gratidão, não há um dia destes 18 anos que eu não agradeça por ter conhecido você.

A todos que fizeram parte, mesmo sem citar nomes, o meu muito obrigada.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

## RESUMO

(Geral)

SANTOS, Carla Regina Gomes Rodrigues. **Quantificação de DNA pró-viral do vírus da Leucemia Felina e avaliação clínica de gatos domésticos mantidos em abrigo.** 2023. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária, Ciências Clínicas). Instituto de Veterinária, Departamento de Medicina e Cirurgia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2023.

A Leucemia viral (FeLV) e a Imunodeficiência felina (FIV) são doenças infectocontagiosas de grande prevalência no Brasil. Como outras doenças infecciosas, as grandes populações são mais expostas. O objetivo geral deste estudo foi avaliar a prevalência destas retrovíroses em um abrigo exclusivo de gatos, quantificar a carga de DNA pró-viral do vírus da Leucemia e, adicionalmente, descrever os achados clínicos e laboratoriais associados. Um total de 115 gatos foram incluídos no estudo. Cinquenta gatos (43,48%) foram positivos para anticorpos contra o vírus da FIV. Todos os gatos estes gatos eram castrados, sendo que (54%) eram fêmeas e 46% machos. Setenta por cento tinham entre 1 e 6 anos de idade e 46% estavam na faixa de peso ideal. Todos os 115 gatos inclusos no estudo apresentavam algum sinal de doença infecciosa do trato respiratório. Já os gatos com infecção pelo FIV apresentaram afecções da cavidade oral, dermatológicas e gastrointestinal. Houve uma associação significativa com o estado reprodutivo castrado ( $p=0,002$ ) e a infecção pelo FIV, além de, significativamente mais velhos ( $p<0,001$ ), e associação com afecções da cavidade oral ( $p<0,001$ ). Os gatos de 1 a 6 anos apresentam aproximadamente 15 vezes ( $p<0,001$ ) mais chance de ter a infecção pelo FIV que os gatos mais jovens. O resultado do hemograma dos gatos FIV positivo revelou o valor de hematimetria ( $p= 0.049$ ) e do hematócrito ( $p= 0.047$ ) significativamente menor que os dos gatos negativos. Vinte e um gatos (18,26%) foram positivos para o FeLV e 10 (8,7%) positivos para o FeLV e o FIV. Não foi encontrada associação significativa entre sexo, estado reprodutivo e a antigenemia do FeLV. Mais da metade dos gatos FeLV positivos tinham entre 1 e 6 anos de idade. Na pesquisa para DNA pró-viral dos 115 gatos, 91 (79.13%) foram não detectáveis e 24 (20.87%) detectáveis. O valor mínimo de detecção foi de 346 cópias/ $10^6$  células e o valor máximo de 46666734.93 cópias/ $10^6$  células. A análise do resultado pesquisa de DNA pró-viral e o teste de triagem para o FeLV identificou 19 (16,52%) com infecção progressiva, 5 (4,35%) dos gatos com infecção regressiva e dois gatos tiveram os resultados discordantes. A quantificação de cópias de DNA pró-viral foi significativamente maior em gatos com infecção progressiva ( $p=0,009$ ). Os gatos FeLV positivos apresentaram valores significativamente menor no valor de hematimetria ( $p=<0.001$ ), hemoglobina ( $p=0.001$ ) e hematócrito ( $p=<0.001$ ).

**Palavras-chave:** gatos, retrovíroses, DNA pró-viral.



## ABSTRACT

SANTOS, Carla Regina Gomes Rodrigues. **Feline leukemia virus DNA proviral quantification and clinical evaluation of sheltered domestic cats.** 2022. Thesis (Doctorate in Veterinary Medicine, Clinical Sciences). Veterinary Institute, Department of Veterinary Medicine and Surgery, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2023.

Leukemia (FeLV) and Feline Immunodeficiency (FIV) are highly prevalent infectious diseases in Brazil. Like other infectious diseases, large populations are more exposed. The general objective of this study was to evaluate the prevalence of these retroviruses in an exclusive shelter for cats, to quantify the load of leukemia virus proviral DNA and, additionally, to describe the associated clinical and laboratory findings. A total of 115 cats were included in the study. Fifty cats (43.48%) were positive for antibodies against the FIV virus. All cats these cats were neutered, and (54%) were females and 46% males. Seventy percent were between 1 and 6 years of age and 46% were in the ideal weight range. All 115 cats included in the study had some sign of infectious respiratory tract disease. Cats with FIV infection, on the other hand, presented oral cavity, dermatological and gastrointestinal disorders. There was a significant association with castrated reproductive status ( $p=0.002$ ) and FIV infection, in addition to being significantly older ( $p<0.001$ ), and association with oral cavity disorders ( $p<0.001$ ). Cats aged 1 to 6 years are approximately 15 times ( $p<0.001$ ) more likely to have FIV infection than younger cats. The result of the blood count of the FIV positive cats revealed the value of hematimetry ( $p= 0.049$ ) and hematocrit ( $p= 0.047$ ) significantly lower than those of the negative cats. Twenty-one cats (18.26%) were FeLV positive and 10 (8.7%) were FeLV and FIV positive. No significant association was found between gender, reproductive status and FeLV antigenemia. More than half of the FeLV positive cats were between 1 and 6 years old. In screening for proviral DNA of the 115 cats, 91 (79.13%) were undetectable and 24 (20.87%) detectable. The minimum detection value was 346 copies/106 cells and the maximum value was 46666734.93 copies/106 cells. The analysis of the results of the proviral DNA test and the FeLV screening test identified 19 (16.52%) with progressive infection, 5 (4.35%) of the cats with regressive infection and two cats had discordant results. The quantification of proviral DNA copies was significantly higher in cats with progressive infection ( $p=0.009$ ). FeLV-positive cats had significantly lower values for blood count ( $p=<0.001$ ), hemoglobin ( $p=0.001$ ) and hematocrit ( $p=<0.001$ ).

**Keywords:** cats, retroviruses, proviral DNA.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	2
2.1 Vírus da Imunodeficiência felina .....	2
2.1.1 Prevalência .....	2
2.1.2 Patogenia .....	4
2.1.3 Sinais Clínicos .....	5
2.1.4 Diagnóstico .....	7
2.2 O Vírus da leucemia Felina – FeLV .....	9
2.2.1 Prevalência .....	10
2.2.2 Patogenia .....	11
2.2.3 Aspectos Clínicos .....	14
2.2.4 Diagnóstico .....	15
2.2.5 Prevenção .....	17
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	19
3.1 Aspectos éticos .....	19
3.2 Período de realização .....	19
3.3 Localização do estudo .....	19
3.4 Seleção dos animais .....	19
3.5 Delineamento experimental .....	19
3.5.1 Identificação dos animais .....	19
3.5.2 Coleta da amostra de sangue total .....	19
3.5.3 Processamento e armazenamento das amostras .....	20
3.5.4 Hemograma .....	20
3.5.5 Diagnóstico de triagem para infecção pelo FIV e o FeLV .....	20
3.5.6 Análise quantitativa por reação em cadeia da polimerase de DNA pró-viral do FeLV (qPCR) .....	20
3.5.6.1 Clonagem de Plasmídeo .....	20
3.5.6.2 Quantificação por qPCR .....	21
3.5.7 Classificação do curso da infecção pelo FeLV .....	21

3.5.8 Parâmetros clínicos .....	21
3.5.9 Registro de óbito e necropsia .....	22
<b>4. ESTATÍSTICA .....</b>	<b>22</b>
<b>5. CAPÍTULOS .....</b>	<b>23</b>
5.1 Capítulo I .....	23
5.2 Capítulo II .....	37
<b>6. CONCLUSÕES GERAIS .....</b>	<b>56</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>57</b>
<b>8. ANEXOS .....</b>	<b>63</b>
8.1 Anexo I .....	63
8.2 Anexo II .....	64
8.3 Anexo III .....	66
8.4 Anexo IV .....	75
8.5 Anexo V .....	80

## 1. INTRODUÇÃO

A infecção pelos retrovírus da leucemia e da imunodeficiência felina são de extrema importância clínica na Medicina Veterinária. Mesmo em países com baixa prevalência, a movimentação é constante para manter a taxa de infecção reduzida. Isto ocorre porque, apesar de cada retrovírus apresentar um mecanismo de patogenia específico, ambos podem levar ao desenvolvimento de graves alterações clínicas com um prognóstico desfavorável. O Brasil é um país com alta prevalência destas retrovirose. A dificuldade no controle populacional de gatos errantes, o número reduzido de animais submetidos ao teste de triagem e a taxa reduzida da vacinação dos gatos contra o vírus da leucemia felina são fatores que colaboram com a alta prevalência.

A Medicina de Abrigo é uma área que se integra a saúde única com o objetivo do bem-estar animal e pela saúde humana. No país, apesar do estímulo para seu desenvolvimento, falta política pública e até mesmo privada para a realização de ampla atividade. Em 2022, foi lançada uma literatura nacional sobre Medicina de Abrigo com os princípios e diretrizes. Assim, na prática o conceito de abrigo no Brasil difere da literatura internacional publicada.

O presente estudo teve como objetivo geral realizar o diagnóstico descrever a prevalência da infecção pelo FeLV e FIV em um abrigo no Rio de Janeiro. Além de, descrever sinais clínicos, alterações hematológicas e fatores de risco associados a infecção pelos retrovírus. E adicionalmente, classificar a infecção pelo FeLV e quantificar o número de cópias de DNA pró-viral e possíveis associações clínicas.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Vírus da Imunodeficiência felina

O Vírus da Imunodeficiência Felina (FIV) é um lentivírus e foi descrito pela primeira vez em 1987, quando identificou-se o agente como causador do adoecimento sequencial de vários gatos em um gatil na Califórnia (EUA) (PEDERSEN et al., 1987). Desde então, relatos em todas as regiões do mundo já foram publicados e muito já se desvendou a respeito deste vírus, o que, pelo menos parcialmente, se justifica pelo fato de compartilhar muitas semelhanças com o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), sendo utilizado como modelo de estudo da patogenia deste (MILLER, 2018) e para o desenvolvimento de antivirais e vacinas (YAMAMOTO, 2007).

#### 2.1.1 Prevalência

O FIV é classificado em seis subtipos (A, B, C, D, E e F) com base nas diferenças de sequência dos genes do envelope viral (env) e do antígeno específico do grupo (gag). Esses subtipos tendem a variar em patogenicidade e antigenicidade e gatos infectados de forma natural podem abrigar vários subgrupos de FIV. No Brasil, o subtipo B é o mais descrito, no entanto há poucos estudos sobre a real prevalência dos subtipos do FIV. Atualmente, é possível encontrar estudos de prevalência em todas as macrorregiões, exceto na região Norte (Quadro 1). Embora diferenças metodológicas entre os estudos dificultem comparações diretas entre eles, aparentemente, o Nordeste é a região brasileira em que o vírus mais se destaca na população felina, com prevalência de até 24% (BARROS et al., 2017). Por outro lado, regiões como o Sul e o Sudeste parecem contar com menores prevalências.

**Quadro 1- Prevalência de animais com diagnóstico positivo para o Vírus da Imunodeficiência Felina (FIV) de acordo com as regiões do Brasil.**

<b>Autores</b>	<b>População</b>	<b>Método diagnóstico</b>	<b>Prevalência</b>
<b>Região Sul</b>			
Da Rosa et al.(2011)	33 gatos	Elisa	3%
Da Costa et al. (2017)	493 gatos	Elisa	10,1%
Biezus et al. (2019)	274 gatos	Elisa	5,84%
<b>Região Sudeste</b>			
Marcondes et al. (2018)	90 gatos	Elisa	5,5%
Teixeira et al. (2007)	145 gatos	PCR	4,14%
Lara et al. (2008)	454 gatos	PCR	14,7%
Sobrinho et al. (2011)	302 gatos	Elisa	5,63%
<b>Região Centro-Oeste</b>			
Poffo et al. (2015)	88 gatos	Elisa+ PCR	12,5%
Silva (2016)	164 gatos	Elisa	11,58%
		PCR	9,75%
<b>Região Nordeste</b>			
Teixeira et al. (2019)	148 gatos	Elisa + PCR	6,1%
Lacerda et al., (2017)	200 gatos (domiciliados)	Imunocromatografia + PCR	6%
	30 gatos (errantes)		6,6%
Rocha et al. (2019)	138 gatos	Elisa	12,32%

Barros et al. (2017)	159 gatos	Elisa ou imunocromatografia	24%
----------------------	-----------	-----------------------------	-----

### 2.1.2 Patogenia

Assim como o HIV, o FIV é um retrovírus de genoma RNA e envelopado, muito lábil no ambiente, sendo a principal via de transmissão a inoculação parenteral (ocorrendo sobretudo no contexto de brigas, quando a saliva de um gato infectado contendo partículas virais ou ainda sangue é inoculado em outro por meio de mordidas) (HARTMANN e SELTON, 2012). A morfologia básica do FIV é constituída por um genoma de RNA, uma glicoproteína transmembrana gp 40, uma proteína da matriz p15, uma proteína do capsídeo p24 e as enzimas transcriptase reversa e integrase. Essas proteínas representam o alvo para os anticorpos neutralizantes produzidos pelo sistema imunológico do hospedeiro. A maioria dos testes diagnósticos detecta anticorpos contra essas proteínas. A transmissão venérea, embora relatada experimentalmente, parece ser uma forma incomum de infecção natural (LITTLE et al., 2020). Já a transmissão vertical da gata infectada para os filhotes parece depender do momento em que se encontra a infecção materna: gatas prenhes infectadas de forma aguda, apresentando altas taxas de replicação viral, parecem transmitir a infecção para a maior parte dos filhotes (LITTLE e KENNEDY, 2015). O mesmo ocorre quando fêmeas cronicamente infectadas possuem baixas contagens de linfócitos T CD4+. No entanto, fêmeas cronicamente infectadas saudáveis têm menor probabilidade de infectar verticalmente os filhotes. Os fatores de risco para infecção compreendem gatos machos, adultos, inteiros, com estilo de vida semidomiciliado (O'NEIL et al., 1996)

Após estabelecida a infecção celular, o vírus inicia o processo de transcrição de uma fita DNA complementar ao seu genoma RNA (também chamado DNA pró-viral), através da enzima transcriptase reversa. O DNA pró-viral recém-sintetizado é então integrado ao DNA da célula hospedeira, por meio da enzima integrase. Essa integração é irreversível, e uma vez ocorrendo, a infecção torna-se vitalícia (KENNEDY e LITTLE, 2015). A cinética viral e a patogenia são influenciadas por diversos fatores como: a idade em que o animal foi infectado (animais jovens desenvolvem doenças relacionadas à imunossupressão mais cedo), a carga viral à que foi exposto e a via de transmissão. Infecções experimentais demonstraram que após a inoculação, células do sistema monocítico-macrofágico removem as partículas virais da circulação e, após isso, passam a replicar nas células alvo em órgãos linfóides (HARTMANN e SELTON, 2012). O tropismo celular do FIV é amplo, e além da infecção de monócitos/macrófagos e,

preferencialmente, linfócitos T CD4+, é capaz ainda de infectar linfócitos T CD8+ (citotóxicos), linfócitos B, astrócitos e células gliais (YAMAMOTO et al. 2007).

Nos primeiros momentos após a infecção, o RNA viral pode ser detectado em grande quantidade na circulação periférica. No entanto, conforme a resposta imunológica é montada, anticorpos anti-FIV começam a ser produzidos contra diversos antígenos virais e a resposta imune celular específica é ativada, suprimindo assim a replicação viral. A partir disso, uma fase assintomática de duração variável e caracterizada pela supressão contínua da contagem de linfócitos T CD4+, se inicia (LITTLE et al., 2020). De fato, a redução na contagem de linfócitos T CD4+ e a inversão da razão CD4:CD8 são características da infecção pelo agente e delas decorrem disfunções tanto nas respostas imunológicas mediadas por linfócitos B como T (YAMAMOTO et al., 2007). Outra população de células infectadas durante as fases iniciais da doença são os linfócitos T reguladores (Treg), um subtipo de linfócitos T CD4+ com função imunossupressora. Acredita-se que o vírus é capaz de induzir um aumento na atividade dos linfócitos Treg em suprimir a resposta imunológica frente a si mesmo, aumentando o sucesso no estabelecimento da infecção e também frente à outros agentes infecciosos, o que potencialmente contribui para a imunossupressão gerada pelo FIV durante o curso da infecção (HARTMANN, 2011).

### **2.1.3 Sinais Clínicos**

Clinicamente, o curso da doença se dá em fases distintas: uma fase inicial (aguda), uma fase latente (assintomática), uma fase com manifestações relacionadas à imunossupressão (complexo relacionado à AIDS- CRA) e a fase terminal, também referida como fase da AIDS felina (HARTMANN e SELTON, 2012). A fase aguda é de baixa mortalidade e pode cursar com sinais como linfadenopatia, febre e linfopenia, embora essas manifestações tenham sido relatadas apenas em infecções experimentais (HARTMANN, 1998). Em seguida, uma fase assintomática de duração variável se inicia, ao longo da qual uma disfunção imunológica cronicamente progressiva ocorre. Muitos animais sequer progridem além dessa fase, podendo atingir a expectativa de vida de um gato não-infectado (HARTMANN, 2012). A fase de CRA é caracterizada pela ocorrência de infecções oportunistas recorrentes e doenças imunomediadas, sendo comum sinais como diarreia, perda de peso, anorexia, linfadenopatia e estomatite crônica. Por fim, a fase da AIDS felina é de alta mortalidade, quando ocorrem manifestações terminais, como quadros neurológicos, neoplasias e infecções oportunistas graves e múltiplas (Figura 1.) (HARTMANN, 2011).



O vírus da imunodeficiência felina tem uma estreita relação com o vírus da imunodeficiência humana no que diz respeito a patogenia, com alterações progressivas e devastadoras no sistema imunológico. É interessante notar, por motivos ainda não totalmente elucidados, que estas alterações raramente são relacionadas a sinais clínicos em gatos. Essa situação tem sido atribuída a limitada exposição a patógenos secundários e oportunistas, as características genéticas do hospedeiro ou subtipo viral. Já em pacientes humanos sem tratamento, a progressão clínica é bem marcante e a evolução clínica da fase inicial até a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) ocorre em um tempo já determinado. O estadiamento e o prognóstico da doença em humanos, inclui considerações sobre a contagem de linfócitos T CD4+ e a avaliação da carga viral (avaliação quantitativa de RNA viral). A citometria de fluxo, o exame para avaliar a contagem de linfócitos T CD4+ e CD8+, ainda é um exame dispendioso e de pouco acesso na rotina clínica da Medicina Veterinária. Assim, uma avaliação completa da infecção de gatos FIV ainda é limitada.

A linfopenia, hiperproteinemia e anemia são as alterações laboratoriais mais encontradas em gatos com infecção pelo FIV. A inflamação da cavidade oral é uma manifestação clínica comum e está associada a infecção pelo FIV em qualquer estágio da doença. A estomatite e a gengivite crônica estão presentes em aproximadamente 50% dos gatos infectados. Outras manifestações também são descritas como: a uveíte, a enterite, a anemia imunomediada, as doenças infecciosas e parasitárias da pele e, menos comum, lesões em sistema nervoso central. O linfoma, as doenças mieloproliferativas e alguns sarcomas e carcinomas são as neoplasias mais usualmente correlacionadas às infecções pelo FIV. Gatos infectados pelo FIV apresentam 5 vezes mais chances de desenvolverem neoplasia do que gatos não infectados (HARTMANN, 2011).

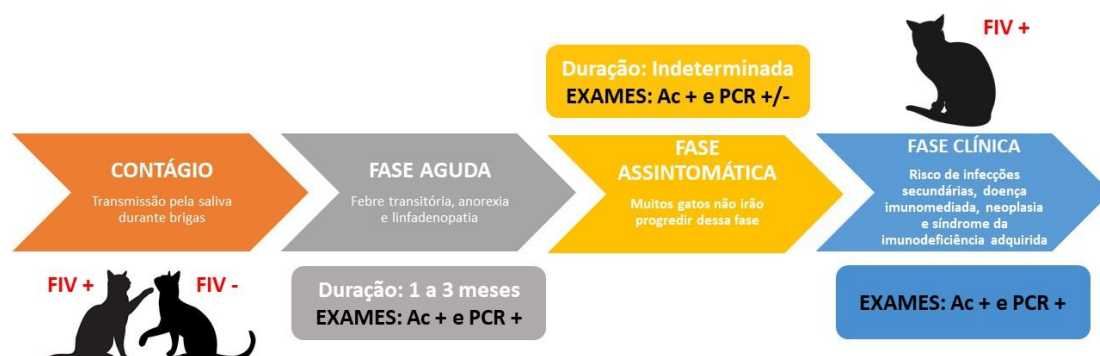


Figura 1. Curso da infecção, resultados laboratoriais e apresentação clínica de gatos com o FIV. Adaptado e traduzido de LITTLE, S. et al. J Fel Med Surg, V.22, n 1 p. 5 – 30, 2020.

#### 2.1.4 Diagnóstico

Devido ao fato do FIV produzir uma infecção persistente da qual o gato jamais se recupera, a detecção de anticorpos é considerada sinônimo de infecção e, por essa razão, o diagnóstico se baseia em testes sorológicos para o vírus (LITTLE et al., 2020). Anticorpos específicos são produzidos em grandes quantidades nos gatos infectados com FIV e passam a ser detectáveis na maioria dos casos a partir de 2 meses de infecção (HARTMANN e SELTON, 2012). Os testes sorológicos empregados com maior frequência na rotina clínica incluem testes do tipo rápido que utilizam tecnologia imunoenzimática (ELISA) ou ainda imunocromatográfica. Estudos comparativos apontaram que a maioria dos testes rápidos comercialmente disponíveis apresentam uma boa sensibilidade e especificidade. O diagnóstico da infecção pelo FIV é feito principalmente com base na detecção de anticorpos específicos em sangue total, no plasma ou no soro. Os gatos infectados apresentam uma alta e contínua produção de anticorpos, o que faz da sua detecção o exame de escolha para o diagnóstico.

Apesar de todos os testes detectarem anticorpos da classe IgG anti-FIV, os anticorpos são direcionados às proteínas específicas como a p15 e a p24 e gp40 do FIV. Assim, os testes diferem na capacidade de detectar anticorpos de acordo com as proteínas virais. Em situações pontuais, a diferença quanto a essas proteínas nestes testes é uma importante ferramenta no diagnóstico de gatos infectados naturalmente pelo FIV.

O emprego da reação em cadeia da polimerase (PCR) na detecção DNA pró-viral e RNA viral é um exame auxiliar na confirmação do diagnóstico da infecção pelo FIV. O uso da PCR como único exame de diagnóstico pode ser falho, visto que no curso da infecção pelo FIV, gatos em fase assintomática tem baixa replicação viral e podem testar falso negativo para PCR de DNA pró-viral. Além disso, a variabilidade genética do FIV e a técnica molecular aplicada podem levar a um resultado falso negativo. Por outro lado, o uso do rt-PCR para RNA viral é capaz de avaliar a carga viral do paciente, e assim torna-se interessante no monitoramento clínico. O resultado positivo deve levar em consideração a idade, a procedência e o histórico do gato. Recentes recomendações implicam em uma avaliação do status do gato em duas etapas, triagem e testes confirmatórios (LITTLE et al., 2020).

A detecção da infecção pelo FIV por meio de testes moleculares, especificamente por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (*Polimerase Chain Reaction*- PCR), pode ser uma alternativa para os casos em que o resultado da sorologia se mostra um fator de confusão (HOHDATSU et al., 1992). Entretanto, diferenças entre os primers utilizados para delimitar o segmento a ser amplificado e a sequência de bases onde os primers deveriam se ligar, causadas por variações entre os diferentes segmentos virais isolados, podem causar sua não-detecção e, portanto, gerar um falso-negativo (CRAWFORD et al., 2005). Além disso, já foi identificado que tanto PCR convencional (qualitativo) quanto o qPCR (quantitativo) podem gerar falsos-positivos em animais vacinados (CRAWFORD et al., 2005; AMMERSBACH et al., 2013).

A razão para isso segue desconhecida até o momento. Por outro lado, o qPCR (quantitativo) possui especificidade de 100% para distinguir animais positivos e negativos não vacinados, embora a sensibilidade baixa (79,3%) limite a utilização deste teste como primeira linha de diagnóstico, devendo ser reservado para a confirmação do resultado de um primeiro teste realizado pela sorologia (AMMERSBACH et al., 2013).

Todavia, em algumas situações, a sorologia pode ser equívoca: em filhotes de gatas FIV-positivas com até 6 meses de idade (em que anticorpos transferidos de forma passiva ainda poderão ser detectados por esta metodologia) (KENNEDY e LITTLE, 2015); quando houver transcorrido tempo insuficiente entre infecção e testagem (como já mencionado, é preciso cerca de 60 dias para que os anticorpos tornem-se detectáveis, com alguns gatos levando muito mais tempo do que isso) (MORTOLA et al., 2004; KENNEDY e LITTLE, 2015); quando houver histórico de vacinação contra o FIV (ANDERSEN e TYRRELL, 2004); e menos comumente, em animais que estão cursando a fase terminal da doença, na qual o sequestro dos anticorpos em complexos antígeno-anticorpo leva a uma redução dos títulos para níveis indetectáveis

(embora especule-se que essa situação é bastante rara em infecções naturais) (HARTMANN e SELTON, 2012). Outros métodos indiretos, como a imunofluorescência indireta (IFA) e o Western Blot (WB), compartilham destas limitações, além de apresentarem menor disponibilidade e maior laboriosidade em comparação aos testes rápidos, podendo ser úteis como testes confirmatórios quando diante de um resultado positivo (figura 2) (LITTLE et al., 2020).

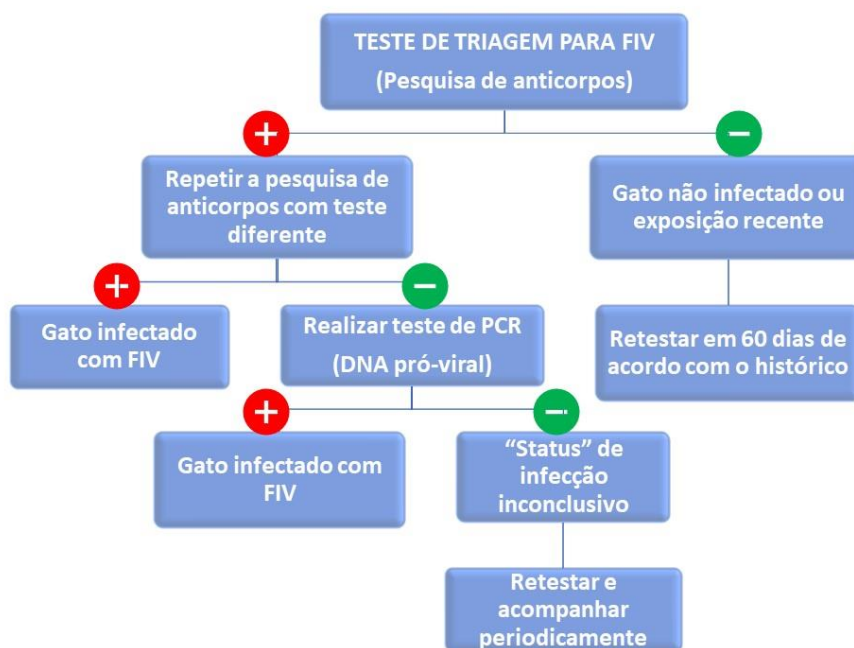


Figura 2. Algoritmo para auxiliar no diagnóstico da infecção pelo FIV. Adaptado e traduzido de Westman M. E. et al. Aust Vet J, v. 97, n. 3, p. 47-55, 2019.

## 2.2 O Vírus da leucemia Felina – FeLV

O FeLV é um retrovírus membro da subfamília Oncornavírus, constituído de uma fita simples de RNA e protegido por um envelope. O DNA viral, após ação da transcriptase reversa (TR), é integrado ao genoma do hospedeiro de maneira aleatória e denominado “pró-vírus”. O FeLV é dividido em vários subgrupos de acordo com seu mapa genético, sendo mais relevantes o FeLV-A, o FeLV-B, e o FeLV-C. Apenas o FeLV-A é contagioso e transmitido horizontalmente de gato para gato na natureza. Os outros subgrupos desenvolvem-se em um gato infectado por FeLV-A pela mutação e recombinação entre este subgrupo e as sequências retrovirais celulares ou endógenas contidas no DNA felino. Os retrovírus endógenos não são patogênicos, são herdados geneticamente e estão normalmente no genoma da população de

gatos. Como principal exemplo temos o enFeLV. Essas frações endógenas de DNA pró-viral são incapazes de produzir partículas virais infecciosas. A principal importância dessas frações de DNA reside no fato de que elas podem se recombinar potencialmente com o DNA do FeLV-A e aumentar sua patogenicidade. O subgrupo B origina-se na recombinação do FeLV-A com o enFeLV, já o subgrupo C é menos comum e é resultado de mutações no gene *env* (HARTMANN, 2015).

A repetição terminal longa (LTR – Long Terminal Repeats) são grandes sequências repetitivas de nucleotídeos encontrados nas extremidades do DNA viral, que desempenham uma função reguladora e controlam a expressão dos outros genes virais. Da extremidade 5' até a extremidade 3', a sequência de genes é LTR-*gag-pol-env*-LTR. O gene *gag* (antígeno associado ao grupo) codifica as proteínas estruturais internas, incluindo p15c, p12, p27 e p10. A proteína do *gag*, p27, rotineiramente usada para diagnosticar a infecção pelo FeLV, é produzida em células infectadas pelo vírus em quantidades que ultrapassam a necessária para a montagem de novas partículas virais. A proteína p27 é encontrada em quantidades abundantes no citoplasma de células infectadas e no sangue de gatos infectados, razão pelo qual os testes de diagnóstico são planejados para detectar essa proteína no sangue ou dentro das células. O gene *pol* (polimerase) especifica a enzima viral transcriptase reversa (TR), responsável pela síntese de DNA a partir do molde de RNA. O gene *env* (envelope) codifica os componentes dos envelopes gp70e p15e. A proteína gp70 define o subgrupo viral e parece ser importante na indução da imunidade. Os anticorpos antigp70 são específicos do subgrupo e resultam de neutralização do vírus e imunidade à reinfeção. Por conseguinte, a proteína gp70 é importante na resistência natural e, assim, atua como alvo para a produção de vacina (HARTMANN, 2015).

### **2.2.1 Prevalência**

A infecção pelo FeLV acomete gatos em todo mundo e a prevalência é dependente da região estudada. Nos Estados Unidos e Canadá, onde a taxa de infecção pelo vírus está estacionada, a prevalência do FeLV tem como base um grande número amostral de gatos e a pesquisa de antígeno viral. Os resultados revelam uma prevalência de 2,3% a 3,4% em uma população testada em torno de 80.000 gatos para o FeLV (LEVY et al., 2006; LITTLE et al., 2009; BURLING et al., 2017). A Austrália é outro país com baixa prevalência, com soroprevalência de 4% para infecção progressiva (WESTMAN et al., 2016). O Brasil é um país com alta e crescente prevalência de infecção pelo FeLV. Os valores descritos podem variar

consideravelmente de acordo com a região estudada e com a técnica de diagnóstico empregada (Tabela 1).

Tabela 1. Valores da prevalência de infecção pelo FeLV em diversos estudos regionais, amostragem e técnica de diagnóstico utilizada no Brasil.

Região	Referência	Amostragem	Técnica de diagnóstico	FeLV +
Sudeste	Hagiwara et al., 1997	298	Pesquisa de antígeno	12,5%
	Barbosa et al., 2001	135	Pesquisa de antígeno	12,6%
	Souza et al., 2002	126	Pesquisa de antígeno	17,5%
	Hagiwara et al., 2007	1952	IFA	6,0%
	Teixeira et al., 2007	40	Pesquisa de antígeno	32,5%
	Coelho et al., 2011	1072	PCR	47,5%
	Almeida et al., 2012	1094	IFA	11,5%
	Marcondes et al., 2018	90	Pesquisa de antígeno	1,10%
Nordeste	Mendes-de-Almeida et al., 2021	556	Pesquisa de antígeno	11,9%
	Martins et al., 2015	120	Pesquisa de antígeno	0,80%
	Barros et al., 2017	159	Pesquisa de antígeno	6,00%
	Lacerda et al., 2017	200	PCR+ Pesquisa de antígeno	3,00%
	Rocha et al., 2019	138	Pesquisa de antígeno	5,10%
Centro-Oeste	Teixeira et al., 2019	148	Pesquisa de antígeno	0,00%
	Aquino et al., 2012	42	PCR	38,0%
		138	PCR	26,80%
Sul	Poffo et al., 2017	88	Pesquisa de antígeno	4,50%
	Silva et al., 2007	65	Pesquisa de antígeno	10,80%
	Meinerz et al., 2010	120	IFA	38,30%
	Da Costa et al., 2017	493	Pesquisa de antígeno	31,00%
	Biezus et al., 2019	274	Pesquisa de antígeno	22,30%

### 2.2.2 Patogenia

Gatos virêmicos eliminam constantemente milhões de partículas virais pela saliva, o que faz dela a principal fonte de infecção. O vírus pode ser eliminado em outros fluidos corporais como secreção nasal, leite, urina e fezes, no entanto o valor a taxa de infecção é menos representativa. O FeLV é transmitido horizontalmente entre gatos “amigos” ao se higienizarem, e entre gatos com comportamento agressivo através de mordedura. O compartilhamento de

comedouro e bebedouro, mesmo que com um potencial menor, também são fontes de contaminação. A transmissão vertical ocorre por via transplacentária, por meio de higienização que a mãe faz diariamente nos filhotes ou durante a amamentação (HARTMANN, 2015).

Após exposição ao vírus, pela via oronasal, ocorre a replicação viral no tecido linfóide orofaríngeo. O curso da infecção irá depender da resposta imunológica do hospedeiro. Gatos com resposta imune eficaz conseguem conter a replicação viral e eliminar o vírus do organismo antes da viremia. Já nos gatos com resposta imunológica ineficaz, após a replicação viral local, há disseminação do vírus em linfócitos e monócitos circulantes (primeira viremia). Dentro de aproximadamente três semanas, ocorre a infecção da medula óssea, onde as células precursoras hematopoiéticas acometidas produzem granulócitos e plaquetas infectadas que circulam por todo organismo do hospedeiro (segunda viremia). Além da medula óssea, há replicação viral em tecidos linfóides distantes, tecido epitelial e mucosas (Figura). A partir da primeira viremia os gatos tornam-se infectantes (HARTMANN e HOFMANN-LEHMANN, 2020).

Recentemente, a classificação quanto a infecção pelo Vírus da leucemia felina foi redefinida com base em métodos moleculares. Após exposição ao FeLV há possibilidade de três resultados: infecção abortiva (antigo gato regressor), infecção regressiva (antiga infecção latente com ou sem viremia transitória) ou infecção progressiva (antiga viremia persistente). Há um consenso de que o curso da infecção após a exposição ao vírus é resultante e depende da intensidade de pressão da infecção, presença ou não de comorbidades, estado imunológico e ambiente estressante ou não (LITTLE et al 2020; WESTMAN et al, 2019).

Experimentalmente, em gatos expostos ao FeLV, em ambiente laboratorial controlado, a taxa estimada de infecção abortiva é de 20-30%, de infecção progressiva é de 30-40% e de infecção regressiva é de 30-40%. No entanto, isso pode não representar a realidade de gatos expostos naturalmente ao vírus, levando em consideração a co-infecção com outros patógenos e várias outras situações de estresse. No entanto, a razão pela qual cada gato irá desenvolver um tipo de infecção após exposição ao vírus não é completamente conhecida. (HARTMANN, 2012; LITTLE et al, 2020)

A infecção progressiva é a condição de viremia persistente após exposição ao FeLV. Os gatos com infecção progressiva são aqueles com resposta imune ineficaz. Eles apresentam intensa replicação viral inicialmente nos tecidos linfóides, e a seguir na medula óssea e nos tecidos epiteliais mucosos e glandulares. Na maioria dos casos, a persistência da viremia por mais de 16 semanas leva ao estado infeccioso pelo resto da vida do animal. A infecção da

mucosa e a infecção glandular está associada a excreção de vírus. Gatos com infecção progressiva desenvolvem doenças associada ao FeLV, e a maioria morre até 3 anos. O risco de desenvolvimento de infecção progressiva fatal depende principalmente do estado imunológico, da idade e da pressão da infecção. Esses animais apresentam baixos níveis de anticorpos neutralizantes detectáveis e resultado positivo para qualquer teste diagnóstico (HARTMANN, 2012; HARTMANN, 2015; HARTMANN e HOFMANN-LEHMANN, 2020).

A infecção regressiva ocorre quando o sistema imune consegue frear a viremia, replicação viral, antes ou pouco após a infecção da medula óssea. Na infecção regressiva, a viremia termina em semanas ou meses. Na maioria dos gatos, a viremia dura apenas 3 a 6 semanas, podendo persistir por até 16 semanas. Porém, em aproximadamente três semanas haverá a infecção das células da medula óssea. Durante todo o período de viremia o gato elimina o vírus e é fonte de infecção. Após contida a replicação viral, não ocorre mais a eliminação do vírus e o gato deixa de transmitir o vírus para outros animais. Esses gatos apresentam baixo risco de desenvolver doenças associadas ao FeLV, embora haja integração do vírus ao seu genoma. O vírus pode permanecer integrado em um pequeno número de células por um longo período, enquanto está sendo mantido sob controle pela resposta imune parcial. Os genes virais podem ser eliminados em 90% dos gatos após 30 meses de infecção regressiva. Esses animais apresentam o teste de triagem para pesquisa de antígeno negativo e PCR para DNA pró-viral positivo (HARTMANN, 2012; HARTMAN, 2015; HARTMANN, 2017, HOFMANN-LEHMANN, 2020).

Experimentalmente, a infecção abortiva é possível em gatos que sofrem exposição a uma baixa carga do FeLV. Na atualidade, não se sabe a frequência com que essa situação ocorre de fato na natureza. A infecção abortiva está relacionada a uma resposta imune celular e humoral eficaz. Após exposição pela via oronasal, a replicação viral no tecido linfóide local é interrompida e animal não desenvolve viremia. Esses animais apresentam níveis elevados de anticorpos neutralizantes e resultado negativo para qualquer outro teste diagnóstico (HARTMANN, 2012; HARTMAN, 2015, HOFMANN-LEHMANN, 2020).

A infecção focal ou atípica é descrita em torno de 10% dos gatos infectados experimentalmente, mas apesar de rara, também ocorre em gatos com infecção natural. É caracterizada pela persistência de replicação viral local atípica como em glândula mamária, bexiga, olhos, baço, linfonodos ou intestino. A mãe com infecção atípica na cadeia mamária pode transmitir para seus filhotes durante a amamentação através do leite, mesmo com teste para antígeno negativo. Essa replicação pode levar a baixa ou intermitente produção de



antígeno. Esses animais podem apresentar resultados discordantes (tabela 3) (HARTMAN, 2015; HOFMANN-LEHMANN, 2020; LITTLE et al., 2020).

Tabela 2. Classificação da infecção pelo FeLV e seus achados clínicos e laboratoriais. (Adaptado de Hartmann, 2017 e Beall et al., 2021)

Classificação da infecção pelo FeLV	Antígeno p27 no sangue	Cultura do Viral do sangue	RNA Viral no sangue	Quantidade de DNA pró-viral no sangue	Anticorpos anti-FeLV	Disseminação viral	Doença associada ao FeLV	Nº de cópias
Progressiva	Positivo	Positiva	Positivo	Alta	Negativo	Sim	Frequente	$> 4 \times 10^5$
Regressiva	Negativo	Negativa	Negativo	Baixa	Baixo	Não	Possível	$< \text{ou} = 4 \times 10^5$
Abortiva	Negativo	Negativa	Negativo	Negativa	Alto	Não	Não	-

### 2.2.3 Aspectos Clínicos

Os sinais clínicos associados a infecção pelo FeLV são inúmeros. Eles estão associados a linfomas e leucemias, imunossupressão, alterações hematológicas, doenças imunomediadas, neuropatias e alterações reprodutivas. São vários os mecanismos que levam a imunossupressão na infecção pelo Vírus da leucemia felina. Dentre eles são citados: a atrofia tímica e depleção da zona paracortical dos linfonodos; linfopenia e neutropenia; decréscimo da função quimiotática e fagocítica de neutrófilos infectados; redução de células T CD4<sup>+</sup>; inversão da proporção CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>; redução na produção de imunoglobulinas; e excesso de citocinas inflamatórias (HARTMANN, 2011).

Gatos infectados com o FeLV tem 62 vezes mais chance de desenvolverem linfoma ou leucemia do que gatos não infectados. Essa relação ocorre pela inserção do genoma viral no genoma celular próximo a um oncogene celular (*myc*), resultando na ativação e super expressão desse gene. Esse é o mecanismo mais importante no qual o FeLV causa neoplasia malignas (HARTMANN, 2012).

As doenças imunomediadas ocorrem em resposta a atividade excessiva e desregulada do sistema imunológico ao vírus. A formação do complexo antígeno anticorpo não é gerado somente pelo vírus, mas também pelas proteínas livres gp70, p27 ou p15E. A anemia hemolítica, glomerulonefrite, uveíte e a poliartrite imunomediada são descritas em gatos positivos para o FeLV (HARTMANN, 2011).

A anemia regenerativa ou arregenerativa, neutropenia cíclica, trombocitopenia, anormalidade de função de plaquetas, aplasia medular e panleucopenia são alterações hematológicas que podem ocorrer em gatos positivos para o Vírus da leucemia felina. A supressão da medula óssea ocorre principalmente pela replicação viral. No entanto, alguns gatos com supressão de medula óssea apresentam infecção regressiva pelo FeLV. A anemia não regenerativa foi encontrada em 5% dos gatos negativos para o antígeno p27 e positivos para o PCR de DNA pró-viral de medula óssea (STÜTZER, B. et al 2010).

#### **2.2.4 Diagnóstico**

O diagnóstico da infecção pelo FeLV é baseado na detecção do antígeno p27 livre no soro, plasma ou sangue total, por meio de teste rápido de triagem (POC). A maior parte dos animais testam positivo dentro de 30 dias após exposição ao vírus, embora a antigenemia possa ocorrer mais tardiamente em alguns animais. Devido a grave consequências que um teste positivo imprime no futuro do animal, um teste adicional é recomendado especialmente em gatos de baixo risco ou assintomáticos (LITTLE et al., 2020). O teste SNAP® Combo FeLV Ag/FIV Ab Test IDEXX (ELISA) e o ALERE/BIONOTE FIV Ac/FeLV Ag Test Kit (imunocromatografia de fluxo lateral unidirecional), são utilizados na rotina clínica e apresentam seus resultados publicados (MEDEIROS et al., 2019). Ambos os kits detectam o antígeno p27 do FeLV e anticorpos da classe IgG anti-FIV, porém, no teste SNAP®, os anticorpos são direcionados para os antígenos p15 e p24, e no teste ALERE para os antígenos p24 e gp40 do FIV. A sensibilidade e a especificidade do teste SNAP® para o FeLV é de 98,6% e 93,5%, respectivamente. Já o teste ALERE possui sensibilidade e especificidade de 100% para o FeLV (MEDEIROS et al., 2019).

Os gatos com infecção progressiva são facilmente identificados com os testes de triagem pela presença de antígeno p27 livre no sangue. Esse resultado é indicativo de antigenemia, que equivale a viremia. Gatos positivos para antígeno que negativam o teste após 16 semanas evoluem para infecção regressiva, onde há baixo ou indetectável nível de antígeno livre (HARTMANN, 2015; LITTLE et al., 2020).

A Imunofluorescência direta (IFA) realizada com amostra de sangue ou medula óssea é mais uma ferramenta no diagnóstico da infecção pelo FeLV. O resultado positivo indica que ocorreu a segunda viremia e que houve infecção da medula óssea pelo vírus. No entanto, não constitui um bom teste de triagem e pode apresentar resultados discordantes. Resultados falso negativo pode ocorrer em gatos com leucopenia e infecção regressiva (LITTLE et al., 2020).

O emprego de técnicas moleculares no diagnóstico da infecção pelo FeLV é de grande importância para compreender o comportamento do vírus no organismo de seu hospedeiro. O uso da técnica molecular de análise da PCR e qPCR (Reação em cadeia da Polimerase e Reação em cadeia da Polimerase em tempo real) específica para região U3 do FeLV-A, permite não só aumentar a sensibilidade no diagnóstico, mas também classificar a infecção pelo FeLV. Desde 2001, com o aprimoramento da técnica de PCR para pesquisa de DNA-pró-viral, é possível determinar a estreita relação entre a carga de DNA-pró-viral e o desfecho da infecção pelo FeLV. Em uma população exposta naturalmente ao vírus, 10% dos gatos apresentaram teste negativo para pesquisa de antígeno viral, mas positivo para DNA pró-viral. O DNA-pró-viral foi encontrado em gatos experimentalmente infectados a partir de 1 a 2 semanas após a infecção experimental, além disso gatos persistentemente infectados apresentaram maior carga de DNA pró-viral (HOFMANN-LEHMANN et al., 2001).

Em 2005, a classificação da infecção pelo FeLV foi definida com base na presença ou ausência de antigenemia e na carga de DNA pró-viral obtida pela técnica de qPCR em sangue periférico de gatos infectados experimentalmente. De acordo com o resultado obtido, a infecção foi classificada em regressiva, progressiva, latente e abortiva (TORRES et al, 2005). A pesquisa de DNA pró-viral pode ser positiva no plasma a partir de sete dias de infecção pelo FeLV, no entanto a carga viral atinge o pico em 3 semanas. Não só a carga de DNA pró-viral mas também a de RNA viral estão envolvidas na patogenia da infecção pelo FeLV. O RNA viral pode ser detectado em uma semana após a infecção experimental. Uma forte correlação foi encontrada entre a carga de RNA viral no plasma e a quantificação de antígeno p27, inclusive maior do que a de DNA pró-viral, além de existir uma estreita relação entre as cargas de DNA pró-viral e RNA viral em gatos experimentalmente infectados. Exames com resultado positivo para antigenemia e DNA pró-viral e negativo para RNA viral podem ser atribuídos a diferença do limite de detecção da técnica. Desta maneira, é recomendado para o diagnóstico da infecção pelo FeLV e caracterização da infecção a combinação de no mínimo dois testes distintos, PCR e RT-PCR ou PCR e pesquisa de antígeno (TANDON et al., 2005).

Ao contrário dos gatos com infecção progressiva, que mantém persistentemente a viremia e está relacionada com a infecção da medula óssea, em gatos com infecção regressiva, onde não há viremia, ocorre uma infecção não produtiva sustentada apenas em um baixo número de linfócitos. A qPCR e RT-qPCR são mais sensíveis para o diagnóstico desse status de infecção do que os demais testes (CATTORI et al., 2008). Mesmo na ausência da antigenemia, é possível detectar RNA viral ativo pela técnica de RNA qPCR. Ainda não há

como definir qual a implicância clínica desses resultados, mas ajuda a esclarecer a relação vírus hospedeiro. Os valores das análises de RNA e DNA qPCR são altamente correlacionados e sensíveis no diagnóstico da infecção pelo FeLV (TORRES et al., 2008). Resultados falso positivo e falso negativo podem ocorrer com o teste da PCR para a infecção pelo FeLV. Resultados falso positivo estão relacionados a contaminação no uso da técnica e falso negativo a mutações na região segmentada do vírus tornando possível a detecção do material genético do vírus (HOFMANN-LEHMANN et al., 2001; GOMES-KELLER et al., 2006; PINCHES et al., 2007; BEATTY et al., 2011; ENGLERT et al., 2012).

O diagnóstico de gatos positivos com infecção regressiva assume total importância devido a possibilidade de reativação viral e pela possibilidade de transmissão através de transfusão de sangue (HELPER-HUNGERBUEHLER et al., 2015; NESINA et al., 2015). Em um recente estudo, gatos infectados experimentalmente e acompanhados por um longo período, revelou a possibilidade de reativação viral e presença de sintomas associados ao FeLV. A reativação viral ocorreu em até 8 anos após infecção inicial, o que enfatiza a necessidade de um acompanhamento clínico e laboratorial de gatos com infecção regressiva (HELPER-HUNGERBUEHLER et al., 2015). Altas cargas virais podem ser encontradas em gatos com viremia, independente do seu status de doença. Em um total de 31 gatos com sinais clínicos associados a infecção pelo FeLV, a análise de RT-qPCR foi positiva em todos os animais. No entanto, apenas 24 dos 31 gatos foram positivos para pesquisa de antígeno, o que fundamenta a sensibilidade do teste molecular. De maneira comparativa, o número de carga de RNA viral presente no tecido esplênico foi maior do que no sangue e na medula óssea (HELPER-HUNGERBUEHLER et al., 2015; ABDOLLAHI-PIRBAZARI et al., 2019).

Recentemente, uma correlação significativa entre o número de cópias de DNA pró-viral e a concentração de antígeno p27 em gatos com infecção pelo FeLV foi estabelecida e padronizada. Gatos positivos com infecção progressiva apresentam o número mínimo de cópia de DNA pró-viral de  $1 \times 10^6$ . Ao contrário, gatos com infecção regressiva apresentam um número inferior a esse de cópias de DNA pró-viral. Esses resultados parecem ser um caminho para entender a relação vírus hospedeiro, bem como realizar o acompanhamento clínico do paciente felino (BEALL, 2019).

### **2.2.5 Prevenção**

As medidas de prevenção contra infecção pelo FeLV são a identificação e a segregação dos gatos positivos e a vacinação contra o vírus dos animais negativos. O uso combinado do

teste e o programa de vacinação é eficaz na redução da prevalência do FeLV. Essa foi a principal razão para o decréscimo da prevalência do FeLV na Europa e na América do Norte. A vacinação pode não impedir a integração do DNA pró-viral após a exposição ao FeLV, em contrapartida protege contra a infecção progressiva. A duração da imunidade contra o vírus em animais vacinados pode variar de 12 a 24 meses. A vacinação prévia não interfere no resultado do teste de triagem, se o animal precisar ser re-testado. Isso se deve ao fato do teste de triagem pesquisar antígeno viral e não a presença de anticorpos. Desde 2013, a diretriz de vacinação da AAFP, recomenda a vacinação contra o FeLV para todos os gatos menores de um ano de idade, por serem mais suscetíveis a infecção. Os filhotes podem ser vacinados a partir de 8 semanas de vida e devem receber duas doses da vacina com intervalo de 3 a 4 semanas. A primeira revacinação deve ser feita um ano após o protocolo vacinal inicial. As demais revacinações irão depender do estilo de vida e do risco de exposição. Gatos com alto risco de exposição ao FeLV devem ser revacinados anualmente. Aqueles que apresentam baixo risco, podem ser revacinados a cada 2 anos. A vacinação não reduz a importância do teste de triagem para identificar e isolar gatos com infecção progressiva. Se um gato é vacinado sem conhecimento do seu status de infecção e em determinado momento apresentar infecção progressiva pelo FeLV, a eficácia vacinal será questionada. Não há valor terapêutico em vacinar em gatos infectados e caso a vacinação ocorra, há risco potencial de reações adversas (LITTLE et al 2020; STONE et al., 2020).

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Aspectos éticos**

Os procedimentos realizados no estudo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro protocolada sob a CEUA nº 9632171120 (Anexo I). O tutor responsável pelos animais do abrigo foi informado sobre os procedimentos realizados por meio do Termo de consentimento Livre e Esclarecido (Anexo II).

#### **3.2 Período de realização**

O estudo foi executado no período de abril de 2021 a abril de 2022, totalizando 18 meses de estudo.

#### **3.3 Localização do estudo**

Todo procedimento clínico foi realizado em um abrigo de gatos localizado no bairro das Laranjeiras, no município do Rio de Janeiro (ANEXO III).

#### **3.4 Seleção dos animais**

No abrigo residiam 115 gatos. O critério de exclusão adotado foi vacinação prévia contra o vírus da leucemia felina e gatos menores de 3 meses de idade

#### **3.5 Delineamento experimental**

##### **3.5.1 Identificação dos animais**

Os animais foram numerados e identificados por meio de registro fotográfico. Dados quanto ao sexo, estado reprodutivo, raça e faixa etária foram armazenados como variáveis para análise final dos resultados. Os animais foram divididos em faixa etária de acordo com a diretriz de estágio de vida do gato publicada recentemente (QUIMBY et al., 2021). Desta maneira divididos em grupo de gatos de 0 até 1 ano de vida, entre 1 e 6 anos de vida, entre 7 a 10 anos de vida e acima de 11 anos de vida.

##### **3.5.2 Coleta da amostra de sangue total**

Não foi utilizado fármaco tranquilizante ou anestésico para contenção dos animais. A contenção física com o emprego de técnica Cat Friendly Practice® (TAYLOR et al., 2022; RODAN et al., 2022) foram utilizadas para minimizar o estresse durante a manipulação dos animais. Os animais não foram submetidos a jejum prévio para coleta de sangue. Em uma única

coleta por punção da veia cefálica ou femoral medial foi obtido o volume total de 5 mL de sangue e distribuídos três tubos contendo etilenodiamino tetra-ácido (EDTA).

### **3.5.3 Processamento e armazenamento das amostras**

### **3.5.4 Hemograma**

A amostra destinada para realização de hemograma foi encaminhada para o laboratório veterinário no mesmo dia da coleta. A técnica de contagem celular global foi realizada pelo analisador hematológico CELL-DYN 3700, com a avaliação citológica pela microscopia óptica. Todos os resultados foram armazenados em planilhas para posterior análise estatística.

### **3.5.5 Diagnóstico de triagem para infecção pelo FIV e o FeLV**

O teste de triagem comercial ALERE FIV Ac/FeLV Ag Test Kit (imunocromatografia de fluxo lateral unidirecional) foi utilizado em todos os animais para pesquisa do antígeno p27 do FeLV e concomitantemente anticorpos para o FIV. A amostra utilizada para realização do teste foi de sangue total, seguiu as instruções do fabricante e realizado no mesmo dia da coleta.

### **3.5.6 Análise quantitativa por reação em cadeia da polimerase de DNA pró-viral do FeLV (qPCR)**

As amostras direcionadas a qPCR de DNA pró-viral do FeLV foram processadas para o armazenamento no Laboratório de Diversidades e Doenças Virais (LDDV) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) no mesmo dia da coleta. As amostras foram armazenadas com o objetivo de análise posterior para concentrar os resultados e seguiram uma ordem sistemática desenvolvida no LDDV/UFRJ.

#### **3.5.6.1 Clonagem de Plasmídeo**

Para a realização da curva padrão da reação de PCR quantitativo (qPCR), um plasmídeo foi sintetizado pela empresa FASTBIO (Ribeirão Preto, SP, Brasil). Foi utilizado o vetor pUC57 com inserção de sequências dos seguintes alvos da qPCR: região LTR de FeLV e o gene do receptor C-C de quimiocina 5 felinos (fCCR5). Esse plasmídeo foi clonado através de choque térmico em bactérias *Escherichia coli* da cepa dh5 alfa. Foi utilizado o QIAGEN Plasmid Midi Kit (QIAGEN Inc, Valencia, CA, USA) para realizar a extração do DNA plasmidial, que foi quantificado utilizando um fluorômetro Qubit 2.0 (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, USA).

### 3.5.6.2 Quantificação por qPCR

A análise de qPCR foi realizada no Laboratório de Diversidades e Doenças Virais (LDDV) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Aproximadamente 2 mL de sangue foram processados por meio de centrifugação por 15 minutos a 10.000 Xg para fracionamento em plasma, camada leucoplaquetária e sangue total. O DNA genômico (DNAg) foi extraído da camada leucoplaquetária com o Pure Link® Genomic DNA Kit (INVITROGEN, Carlsbad, CA, USA). A integridade das amostras de DNA foi verificada por meio de reações de PCR convencional que tinham como alvo o gene mitocondrial citocromo B, com iniciadores e condições descritas por Naidu et al. (2012). A quantificação de DNAg foi realizada pelo Nanodrop NanoVuePlus™ (GE HEALTHCARE). Iniciadores e sondas descritos por Powers et al. (2018) foram utilizados na quantificação da sequência LTR de FeLV e do gene fCCR5. A quantificação absoluta do número de cópias de LTR e CCR5 foi mensurada em uma máquina 7500 Fast Real-Time PCR system (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, USA) utilizando como curva padrão diluições seriadas do plasmídeo ( $10^3$  -  $10^{10}$  cópias). O número de células foi calculado através da quantificação absoluta do número de cópias do gene CCR5 que possui duas cópias por genoma felino. A carga pró-viral foi calculada através da razão entre o número de cópias de LTR e número de células.

### 3.5.7 Classificação do curso da infecção pelo FeLV

A classificação quanto ao curso de infecção pelo FeLV teve como base na última diretriz publicada (LITTLE et al., 2020). Os gatos classificados com infecção progressiva foram aqueles com resultado do teste de triagem positivo para antígeno p27 e qPCR para DNA pró-viral detectável. E os animais com resultado do teste de triagem negativo com qPCR para DNA pró-viral indetectável foram classificados com infecção regressiva.

### 3.5.8 Parâmetros clínicos

O escore corporal e a presença de sintomatologia clínica de doença foram os dados clínicos analisados e arquivados para posterior análise e correlação com o status das duas retrovirose. A avaliação do escore corporal seguiu as diretrizes do *World Small Animal Veterinary Association*. (WSAVA, 2011). Os sinais clínicos foram descritos em uma ficha clínica (ANEXO IV).



### 3.5.9 Registro de óbito e necropsia

Foi realizado o registro dos gatos que morreram durante o estudo e os animais foram encaminhados para a necrópsia. As lesões microscópicas encontradas no exame histopatológico destes animais foram registradas para análise posterior

## 4. Estatística

Foi adotado neste trabalho a significância de 5%. P-valores menores que 5% serão considerados significantes e destacados com um \* (significante a 5%). Dois asteriscos (\*\*) indicam significância a 1% e três (\*\*\*) indicam significância a 0,1%. A análise descritiva foi realizada com cálculos de frequência relativa para as variáveis categóricas e cálculo de medidas de centralidade e dispersão das variáveis numéricas (mínimo, máximo, média, mediana, desvio padrão e quartis). Os testes estatísticos paramétricos e não paramétricos foram utilizados de acordo com o teste de normalidade das variáveis como o Teste de Shapiro-Wilk; Teste t; Mann-Whitney; Anova one-way; Teste HSD de Tukey; Kruskal-Wallis; Teste de Dunn; Teste Chi-Quadrado; Teste Exato de Fisher; Teste Z para igualdade de proporções. Foi calculada a razão de chance, bem como o intervalo de confiança para entender os fatores de risco, acompanhada pelo p-valor correspondente. As presentes análises foram feitas através do software livre R (R version 4.1.1 (2021-08-10)). R Core Team (2021). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

## 5. CAPÍTULOS

Os resultados desta tese serão apresentados no formato de dois artigos científicos. Cada capítulo corresponde a um dos artigos. O capítulo I e II foi redigido no formato da revista *Comparative immunology, Microbiology & infectious diseases*, ISSN: 0147-9571, 2021: 2.729 © Clarivate Analytics Journal Citation Reports 2022. Instrução ao autor no ANEXO V.

### 5.1 Capítulo I. Epidemiological study of and risk factors for feline immunodeficiency virus (FIV) infection in a shelter in Southeast Brazil

Carla Regina Gomes Rodrigues Santos<sup>a</sup>, Grazielle Moraes de Rezende<sup>b</sup>, Julia Possebon<sup>a</sup> Santi, Renata Beranger<sup>c</sup>, Ricardo Mouta Borges de Medeiros<sup>d</sup>, Liliane Tavares de Faria Cavalcante<sup>d</sup>, André Felipe Andrade dos Santos<sup>d</sup> Heloisa Justen Moreira de Souza<sup>d</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Medicina e Cirurgia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, Brazil

<sup>b</sup>Veterinarian – Rio de Janeiro, Brazil

<sup>c</sup>Infectologist, Rio de Janeiro, Brazil

<sup>d</sup>Laboratório de Diversidade e Doenças Virais (LDDV), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

#### Abstract

One hundred fifteen cats were included in this study and 50 of them (43,48%) were found to be positive for anti-FIV antibodies and 21 (18,26%) were positive for FeLV p27 antigen. 8,7% (10/115) were positive for both. All cats included in the study had shown infectious respiratory disease. The positive status for FIV had a significant association with being neutered ( $p=0,002$ ). Those cats were also more likely to be older ( $P <0,001$ ), and to have oral diseases ( $p <0,001$ ). Sex, neuter status, body condition score, and the presence clinical signs of gastrointestinal, oral cavity, or dermatological diseases did not appear as risk factors to FIV infection in this study. No significant hematological changes were found in FIV positive cats. The FIV-positive status ( $p=0,008$ ; OR 6.45; IC95% 1.66-25.01) and lower BCS ( $p=0,002$ ; OR 1.798; IC 95% 1.241-2,603) were significantly associated with death.

**Keywords:** Retrovirose, cat, prevalence, infectious disease, lentivirus

## **1. Introduction**

The cat population in Brazil has increased considerably in the last years. This species has earned its space among Brazilian households but, at the same time, the stray cat population has been growing disorderly, as a result of lacking public policies for the prevention of abandonment and population control [1]. At the same time, shelter medicine is a specialty on the rise, though still incipient in the country. The concept of shelter as an institution where animals are brought in for screening, recovery, socialization, and reintroduction into society by adoption, is not a reality as it is in developed countries [1,2]. Rather, individual independent rescuers are a majority, frequently using their own houses as shelter facilities. This strategy fails most of the time, resulting in the hoarding of animals in poor sanitary and structural conditions [3]. Commonly, these places become a life-long residence for many of those animals, who are forced to live in overcrowded situations, favoring the spread of many infectious diseases, such as feline retroviruses.

The Feline Immunodeficiency Virus (FIV) is the agent for a high-impact infectious disease in cats [4]. The FIV infection may lead to immunosuppression, immune-mediated diseases, neoplasias, and neurologic disorders, hence substantially affecting their quality of life. The FIV is an RNA-genome enveloped lentivirus extremely labile in the environment, and its main transmission route is via parenteral virus-rich saliva inoculation, especially through bites [5]. Intact, older than 3 years old male cats that have indoor access, cats with upper respiratory infections and shelter cats are at a bigger epidemiological risk to acquire the infection [6,7,8,9].

The virus was first identified and described in California, USA, more than three decades ago, as the responsible agent for the outbreak of illness in cats from a shelter [4]. Since then, numerous reports from many regions of the globe were published and consensus guidelines were issued to help clinicians address and manage the disease [10]. Currently, in Brazil, there are prevalence studies from the South, South-East, North-East, and Middle-East macroregions [9,11,12,13]. Nonetheless, the prevalence of FIV infection in shelter facilities has not been described extensively. The objectives of the present study were to determine the prevalence of FIV infections in a population of rescued cats living in a shelter; to determine the clinical signs and hematological findings associated with FIV seropositivity in cats; to assess the mortality rate in the studied Shelter.

## **2. Materials and methods**

### **2.1 Ethics approval**

All procedures herein described were approved by the Ethics Committee on the Use of Animals of the Veterinary Institute of the Federal Rural University of Rio de Janeiro (protocol n° 9632171120).

## **2.2 Animals and data collection**

This study was carried out from April 2021 to April 2022. All clinical procedures were done in an animal shelter in Rio de Janeiro, Brazil. At the beginning of the study, 115 cats lived in the shelter. The exclusion criteria were: cats aged less than three months old, those with a history of vaccination against the Feline Leukemia Virus, and those who did not tolerate physical restraint for sample collection. Collected data included reproductive status, sex, breed, age, body condition score (BCS) according to the World Small Animal Veterinary Association (2020), and the presence of clinical signs. At the end of the observational period, a comparative assessment considering retroviral status and survival was carried out. All the cats that died during the study were submitted to a necroscopic examination. The macro- and microscopic lesions found at histopathology were noted for subsequent analysis.

## **2.3 Haematology and FIV testing**

Blood sampling was conducted under gentle physical restraint and a total of 5 mL was drawn from either the cephalic or medial saphena vein of each cat. The total volume was then divided between two EDTA-treated tubes, receiving 1 mL each. One tube was then sent to hematologic analysis and the other to retroviral diagnosis. Haematology was performed utilizing the hematology analyzer auto-analyzer Celldyn 3700. The retroviral testing was obtained through a point-of-care immunochromatographic test (ALERE FIV Ac/FeLV Ag Test Kit ®) for FeLV p27 antigen and anti-FIV antibodies. All tests were run using total blood and according to the manufacturer's instructions.

## **2.4 Statistical analysis**

It was adopted in this work the significance of 5%. P-values lower than 5% will be considered significant and highlighted with an \* (significant at 5%). Two asterisks (\*\*) indicate significance at 1% and three (\*\*\*) indicate significance at 0.1%. Descriptive analysis was performed with relative frequency calculations for categorical variables and calculation of measures of centrality and dispersion of numerical variables (minimum, maximum, mean, median, standard deviation and quartiles). Parametric and non-parametric statistical tests were used according to the normality test of variables such as the Shapiro-Wilk test; t test; Mann-

Whitney; Chi-Square Test; e Fisher's Exact Test. The odds ratio was calculated, as well as the confidence interval to understand the risk factors, accompanied by the corresponding p-value. The present analyzes were performed using the free software R (R version 4.1.1 (2021-08-10)). R Core Team (2021).

### 3. Results

Total of 56,52% (65/115) were female and 43,48% (50/115) were male cats. Of these 87,83% (101/115) were neutered and 12,17% (14/115) were intact. Total of 29,57% (34/115) were between 0 and 1 years old, 51,3% (59/115) were between 1 and 6 years old, 16,52% (19/115) were between 7 and 10 years old, and 2,61% (3/115) were older than 11. Regarding body condition score, 46,08% (53/115) of the cats were considered to be in their ideal weight (BCS 4-5), 6,96% (8/115) were underweight, and 46,97% (54/115) were overweight. 67% of the cats had a score between 6 and 9.

Fifty cats (43,48%) were found to be positive for anti-FIV antibodies and 21 (18,26%) were positive for FeLV p27 antigen. 8,7% (10/115) were positive for both anti-FIV antibodies and FeLV p27 antigen. All FIV-positive cats were neutered, and 54% (27 cats) were females while 46% (23/50) were males. 6% (3/50) of the cats were between 0 and 1 year old, 70% (35/50) were between 1 and 6 years old, 22% (11/50) were between 7 and 10 years old and 2% (1/50) were older than 11 years old. 46% (28/50) had an ideal body condition score.

All cats (115) included in the study had shown infectious disease clinical signs such as sneezing, cough, conjunctivitis, and nasal and/or ocular secretion. 22% of the FIV-infected cats had evidence of oral cavity disease, namely periodontitis, and gingivostomatitis. 18% had dermatological signs such as pruritus, alopecia, eosinophilic plaques, and otitis. 6% had signs of gastrointestinal diseases, like diarrhea, vomiting, or inappropriate elimination.

The positive status for FIV had a significative association with being neutered ( $p=0,002$ ). Those cats were also more likely to be older ( $P <0,001$ ), and to have oral diseases ( $p <0,001$ ). Cats aged from 1 to 6 years were 14,7 x more likely to be FIV-infected than younger cats ( $p <0,001$ ), and cats aged 7 to 10 years were 13,2 x more likely to be FIV-infected than those aged from 1 to 6 years old. Other features such as sex, neuter status, body condition score, and the presence of gastrointestinal, oral, cavity, or dermatological diseases' clinical signs did not appear as risk factors in this study (Table 1).

The abnormal laboratory findings in the CBC of FIV-positive cats were anemia, thrombocytopenia, eosinopenia, and lymphopenia. When comparing the blood count results of FIV-positive cats with the results of negative cats, the erythrocytes count (RBC) and hematocrit (HCT) were significantly lower for positive cats ( $p=0.049$  and  $p=0.047$ , respectively). Despite this result, all mean CBC parameters of the 40 cats positive only for FIV were within the reference ranges (Table 2). 29/115 cats (25,22%) died during the observational period. Among these cats, 11 were only positive for FIV. The FIV-positive status ( $p=0,008$ ; OR 6.45; IC95% 1.66-25.01) and lower BCS ( $p=0,002$ ; OR 1.798; IC 95% 1.241-2,603) were significantly associated with death, whereas FIV-negative status and higher BCSs were not.

#### 4. Discussion

This study showed the prevalence of FIV infections in a shelter exclusive for cats in the southeast region of Brazil. In this country, animal shelters differ from developed countries, especially regarding regulation, resources, and funding. Structural issues and a lack of resources for basic sanitary measures, such as massive retroviral testing, are among the stumbling blocks faced by shelter keepers [1]. The specialty of Shelter Medicine, albeit in ascension, is still underdeveloped. The scarcity of public policies and funding for these establishments often makes the rehabilitation and resocialization of unowned animals unfeasible [2]. Therefore, private shelters in precarious conditions where the spreading of infectious diseases is commonplace account for the majority of such institutions [3]. The present study reflects this reality and underscores the necessity for regulation of public policies targeting the current shelter situation.

The prevalence of FIV infection in this study show high rate with 43.48% of positive cats. In Brazil, Only one previous study describes such a prevalence of FIV infection. In 2002, 2003 and 2004, the prevalence value for FIV infection was respectively 55.3%, 57.4% and 75.8% in RIOZOO (Mendes-de-Almeida et al., 2007). Studies from North America, Australia, and the United Kingdom report significantly lower prevalence rates, of 2.6%, 6%, and 11.4% respectively [6,7,8].

This disparity is most likely attributable to the socioeconomic difference between underdeveloped and developed countries, as previously compared. A lower-income economy as in this study's scenario is related to a higher percentage of feral cats and unowned cat colonies, where this virus is known to circulate efficiently, and lower investments in animal welfare and population control programs [14].

Prevalence studies on FIV infection exist in all of Brazil's macro-regions, except for the North region. In the Midwest, the prevalence of FIV-positive cats treated at a University Hospital was 12.5% [12]. In the South region, a cross-sectional study and a retrospective study revealed a prevalence of 5.84% and 10% respectively for FIV infection [9,15]. In the Southeast region, a study with a total of 145 cats from two shelters presented a prevalence of only 4.14% after PCR analysis [16]. The molecular technique is not the preferential screening test for the diagnosis of FIV infection, since the viral load may be undetectable according to the stage of the disease [10]. In the Northeast region, where studies on the prevalence of FIV infection are concentrated, values from 6% to 24% have been described [13,17,18,19,20].

Neutered cats had a significant association with a positive FIV status. This may have been due to the fact that the vast majority of cats in this shelter were neutered. Surprisingly, there was no significant association between FIV infection and sex or race. However, historically, studies have shown that male, non-purebred cats that have access to the outdoors are most likely to be infected with FIV since they are prone to exhibit agonist behaviors (i.e.: fights over territory, females, and resources) [6,9,21]. Notwithstanding, no research was carried out regarding the manifestation of aggressive behavior in this shelter. Fighting episodes were observed, mainly associated with environmental management errors and not aggressiveness itself, and animals did not have free access to the external areas.

Cats aged between 1 and 6 years, in addition to having a significant association with FIV infection, represented a risk factor for the disease. The study by Liem and colleagues (2017) demonstrated that the risk of being FIV-infected was greater for cats over 5 years old than for cats 5 years old or younger. Other studies have also reported age as a risk factor for FIV infection, possibly due to the cumulative risk that comes with prolonged exposition [8,22,23]. Other variables such as gender and reproductive status did not represent a risk factor in this study. However, in non-shelter-based studies, intact male cats are overrepresented, most likely because of their frequent manifestation of agonist behavior, as previously discussed [7,22,24]. The body score in this study did not appear to represent a risk factor for FIV infection, as well as in a study carried out in shelters in the United Kingdom [8]. Nonetheless, the FIV positivity in this study showed to be significantly associated with oral cavity disease, a finding that has consistently been described by other authors [5,25,26,27]. At this moment it is still unknown why these cats are overrepresented in oral cavity disease studies, but it is likely that the immune dysregulation that occurs in this infection course plays a role [5,28]. The number of cats cohabiting is also a known risk factor for gingivostomatitis, which may have further increased

the study's cats susceptibility to the disease, considering the overcrowding they were found to be living at [29].

All cats included in the study had some sign of respiratory tract disease. This finding is not surprising, considering these animals were not fully vaccinated against feline herpesvirus-1, calicivirus, and chlamydiosis, and the shelter overcrowding conditions facilitate the spreading of these infectious agents. The European Advisory Board on Cat Diseases published a guideline for the prevention of infectious diseases in shelter cats that emphasizes an individualized vaccination schedule [30]. Nonetheless, because of the resource constraints already discussed, it is hardly put into practice in Brazil's shelter facilities. In a large study where data from client-owned and shelter cats were analyzed, of a total of 4835 cats with signs of respiratory disease, only 6.4% were positive for FIV [7]. In fact, despite the immunologic impairment caused by the FIV, predisposing the host to opportunistic infections, respiratory diseases do not appear to be as commonly related directly to the infection as other diseases (renal, neurologic, oral, and oncologic) [5]. Therefore, the authors considered this finding to be more related to the shelter's intrinsic conditions (overcrowding, low vaccine coverage, stressful environment) rather than the retrovirus status itself.

Dermatological and gastrointestinal signs were found in the present study in 18% and 6% of the FIV-positive cats reported here, respectively. Affections of these systems are often associated with infection by this retrovirus [8,21]. Nonetheless, the presence of clinical signs of gastrointestinal, dermatological, and oral cavity disease did not represent a risk factor for infection in this study.

In the present study, the value of hematological parameters, RBC, and HCT was significantly lower in the group of positive cats. Hematological abnormalities are frequently reported among FIV-positive cats [5,31]. Notwithstanding, the study by Liem and colleagues (2013) did not find a difference in the frequency of hematological abnormalities between FIV-positive and negative cats. In the same study, the lifespan was also not significantly different [21]. Similar findings have been described by others [33,34]. In the present study, despite the increased prevalence of abnormalities in the FIV-infected cat's blood count, all hematological parameters of FIV-positive cats remained within the reference ranges. The mortality rate was not compared between FIV-infected and non-infected cats, however, the FIV-positive status was a significant risk factor for death, as were cats with lower body scores. Possibly, this finding can be at least partially explained by the differences in housing conditions between the cats herein described and the ones from these studies. As previous demonstrated, FIV-infected cats



housed in overcrowded facilities had a much more guarded prognosis than their counterparts living in households where <2 cats cohabited, with 63% of the observed cat dying during the observational period, mostly from malignancies as lymphoma [34].

This study has several limitations. First, the reason for the high prevalence of FIV-infected animals in this study remains to be determined. A research that aimed to evaluate evidence of FIV transmission in shelter cats where negative cats and experimentally infected cats cohabited showed that the prevalence remained unchanged despite up to 8 years of coexistence [36]. In the present study, almost half of the cats that cohabited the place were positive in the test performed. The constraints of the limited observation period for data collection did not allow the evaluation of the transmission rate. However, the authors hypothesized that this result may be related to the high rate of transmission inside the shelter premises due to elevated population density and constant competition for resources. Alternatively, these animals may have been rescued already infected and the fact remained unnoticed due to the absence of laboratory control on admission.

## Conclusion

The prevalence of FIV infection in the shelter studied is the second highest published to date in Brazil. The actual moment of infection of these animals cannot be described but reflects the lack of financial and structural resources to maintain the screening of animals rescued and kept in the shelter.

## Referências

- [1] GALDIOLI, L.; ROCHA, Y. S. G.; GARCIA, R. de C. M. Profile of Brazilian dog and cat shelters regarding external and internal policies. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 9, 2022.
- [2] HURLEY K. F., LEVY J. K. Rethinking the Animal Shelter's Role in Free-Roaming Cat Management. **Frontiers in veterinary Science**, v. 9, p. 1-11, 2022.
- [3] GRIFFIN, Brenda. Feline care in the animal shelter. **Shelter Medicine for Veterinarians and Staff**, p. 145-184, 2012.
- [4] PEDERSEN, N. C. *et al.* Isolation of a T-lymphotropic virus from domestic cats with an immunodeficiency-like syndrome. **Science (New York, N.Y.)**, v. 253, p. 790-793, 1987.

- [5] HARTMANN, K. Clinical aspects of feline retroviruses: a review. **Viruses**, v. 4, n. 11, p. 2684-2710, 2012
- [6] WESTMAN, M. E. *et al.* Seroprevalence of feline immunodeficiency virus and feline leukaemia virus in Australia: risk factors for infection and geographical influences (2011–2013). **Journal of Feline Medicine and Surgery Open Reports**, v. 2, n. 1, p. 1-11, 2016
- [7] BURLING, A. N. *et al.* Seroprevalences of feline leukemia virus and feline immunodeficiency virus infection in cats in the United States and Canada and risk factors for seropositivity. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 251, n. 2, p. 187-194, 2017.
- [8] STAVISKY J., DEAN R. S., MOLLOY M. H. Prevalence of and risk factors for FIV and FeLV infection in two shelters in the United Kingdom (2011-2012). **Veterinary Record**, v. 181, n. 17, p.451, 2017.
- [9] BIEZUS G. *et al.* Prevalence of and factors associated with feline leukemia virus (FeLV) and feline immunodeficiency virus (FIV) in cats of the state of Santa Catarina, Brazil. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Disease**, v. 63, p. 17-21, 2019.
- [10] LITTLE, S. *et al.* 2020 AAFP Feline Retrovirus Testing and Management Guidelines. **Journal of feline medicine and surgery**, v. 22, n. 1, p. 5-30, 2020.
- [11] MARCONDES M. *et al.* Infection by *Mycoplasma* spp., feline immunodeficiency virus and feline leukemia virus in cats from an area endemic for visceral leishmaniasis. **Parasites & Vectors**, v. 11, n. 1, p. 131, 2018.
- [12] POFFO, D. *et al.* Feline immunodeficiency virus (FIV), feline leukemia virus (FeLV) and *Leishmania* sp. in domestic cats in the Midwest of Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, p. 491-494, 2017.
- [13] TEIXEIRA B. M., *et al.* Feline immunodeficiency virus in Northern Ceará, Brazil. **Journal of Feline Medicine and Surgery Open Reports**, v. 5, n. 2, p. 1-7, 2019
- [14] LUDWICK K., CLYMER J. W. Comparative meta-analysis of feline leukemia virus and feline immunodeficiency virus seroprevalence correlated with GDP per capita around the globe. **Research in veterinary Science**, v. 125, p. 89-93, 2019.

- [15] COSTA, F. V. A. *et al.* Hematological findings and factors associated with feline leukemia virus (FeLV) and feline immunodeficiency virus (FIV) positivity in cats from southern Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, p. 1531-1536, 2017.
- [16] TEIXEIRA, B. M. *et al.* Ocorrência do vírus da imunodeficiência felina e do vírus da leucemia felina em gatos domésticos mantidos em abrigos no município de Belo Horizonte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, p. 939-942, 2007.
- [17] ROCHA, M. A. *et al.* Seroprevalence of feline immunodeficiency virus and feline leukemia virus in domestic cats of Fortaleza, Ceará. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 56, n. 1, p. e146687-e146687, 2019.
- [18] LACERDA L. C. *et al.* Feline immunodeficiency virus and feline leukemia virus: frequency and associated factors in cats in northeastern Brazil. **Genetics and molecular research : GMR**, v. 16, n.2, p. 1-8, 2017.
- [19] BARROS, V. R. *et al.* Epidemiology of feline immunodeficiency virus and feline leukemia virus in a veterinary teaching hospital. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal: RBHSA**, v. 11, n. 2, p. 151-160, 2017.
- [20] MARTINS. N. S. *et al.* Occurrence of feline immunodeficiency virus (FIV) and leucemia (FeLV) in São Luís-MA. **American Journal of Animal and Veterinary Sciences**, v. 10, n. 3, p.187-192, 2015.
- [21] LIEM B. P. *et al.* Clinical findings and survival in cats naturally infected with feline immunodeficiency virus. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 27, n. 4, p. 798-805, 2013.
- [22] LEVY, J. K. *et al.* Seroprevalence of feline leukemia virus and feline immunodeficiency virus infection among cats in North America and risk factors for seropositivity. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 228, n. 3, p. 371-376, 2006.
- [23] SPADA E. *et al.* Seroprevalence of feline immunodeficiency virus, feline leukaemia virus and *Toxoplasma gondii* in stray cat colonies in northern Italy and correlation with clinical and laboratory data. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 14, p. 369-377, 2012.
- [24] COURCHAMP F. *et al.* At-risk individuals in Feline Immunodeficiency Virus epidemiology: evidence from a multivariate approach in a natural population of domestic cats (*Felis catus*). **Epidemiology and Infection**, v. 121, p. 227-236, 1998.

- [25] YAMAMOTO J., *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. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 194, p. 213, 1989.
- [26] TANIWAKI S. A., FIGUEIREDO A.S., ARAUJO J.P. Virus-host interaction in feline immunodeficiency virus (FIV) infection. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Disease**, v. 36, p. 549–557, 2013.
- [27] KORNYA M. R. *et al.* Association between oral health status and retrovirus test results in cats. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 245, n.10, p. 1101, 2014.
- [28] HAIPEK *et al.* CD4+ and CD8+ t lymphocyte counts and ratio in cats with chronic gingivostomatitis and naturally infected with feline immunodeficiency virus: a preliminary study. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 16 n. 4, 2022.
- [29] PERALTA S., CARNEY P.C. Feline chronic gingivostomatitis is more prevalent in shared households and its risk correlates with the number of cohabiting cats. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 21, n. 12, p. 1165-1171, 2019.
- [30] MOSTL K., *et al.* Prevention of infectious diseases in cat shelters: ABCD guidelines. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 15, n. 7, p. 546-554, 2013.
- [31] GLEICH S., HARTMANN K. Hematology and serum biochemistry of feline immunodeficiency virus-infected and feline leukemia virus-infected cats. **Journal of veterinary internal medicine**, v. 23, n.3, p. 552-558, 2009.
- [32] RAVI M., WOBESER G. A., TAYLOR S. M., JACKSON M. L. Naturally acquired feline immunodeficiency virus (FIV) infection in cats from western Canada: Prevalence, disease associations, and survival analysis. **Canadian Veterinary Journal**, v. 51, n.3, p. 271-276, 2010.
- [33] SPADA E., PEREGO R., SGAMMA E. A., PROVERBIO D.. Survival time and effect of selected predictor variables on survival in owned pet cats seropositive for feline immunodeficiency and leukemia virus attending a referral clinic in northern Italy. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 150, p. 38-46, 2018.
- [34] BECZKOWSKI P. M., *et al.* Contrasting clinical outcomes in two cohorts of cats naturally infected with feline immunodeficiency virus (FIV). **Veterinary Microbiology**, v. 176, p. 50-60, 2015.

[35] POLI A., TOZON N., GUIDI G., PISTELLO M. Renal alterations in feline immunodeficiency virus (FIV)-infected cats: a natural model of lentivirus-induced renal disease changes. **Viruses**, v. 4, n. 9, p. 1372-1389, 2012.

[36] LITSTER A. L. Transmission of feline immunodeficiency virus (FIV) among cohabiting cats in two cat rescue shelters. **The Veterinary Journal**, v. 201, n. 2, p. 184-188, 2014.

Table 1. Risk analysis of gender, age group, body score and clinical signs of FIV-positive cats.

Feature	Variables	OR	IC95%	p-value
Sex	Male	1.084	(0.432, 2.719)	0.864
	Female	-		
1 to 6 years		14.733	(3.677, 59.032)	<0.001***
7 to 10 years		13.238	(2.72, 64.425)	0.001**
> 11 years		7.191	(0.463, 111.563)	0.158
BCS		0.778	(0.534, 1.132)	0.189
GI signs	Yes	1.337	(0.144, 12.374)	0.798
	No	-		
Dermatologic signs	Yes	2.038	(0.534, 7.777)	0.297
	No			
Oral cavity disease	Yes	3.979	(0.902, 17.559)	0.068
	No			

Table 2. Statistical analysis of the blood count of 40 only only FIV-positive cats

Variable	Reference range	Min-Max	Q1-Q2	Median	Mean (DP)
<i>RBC (x106/<math>\mu</math>L)</i>	5 a 10	4.83-9.79	6.1-8.58	7.53	7.42 (1.37)
<i>HGB(g/dL)</i>	8 a 15	7.25-13.9	8.94-12.03	10.55	10.51 (1.73)
<i>HCT (H%)</i>	24 - 45	23-43.7	28.15-36.88	32.7	32.48 (5.56)
<i>PLT</i>	200000 - 800000	23000-486000	227000-281325	255100	257702.5 (62177.79)
<i>WBC (x 103/<math>\mu</math>L)</i>	5500 - 19500	6250-101000	10825-20700	14450	18351.5 (15391.78)
<i>Band neutrophils</i>	0 -300	0-370	0-0	0	24.9 (72.08)
<i>Segmented neutrophils</i>	2500 - 13000	3240-43146	6996.5-12679.25	9216	11225.08 (6996.43)
<i>Eosinophils</i>	110 - 1500	0-3825	312-909.75	557.5	771.48 (746.15)
<i>Lymphocytes</i>	1100 - 9000	938-9306	2060.25-4079.75	2687	3441.9 (2201.75)
<i>Monocytes</i>	55 - 780	62-2691	244.5-746.25	451.5	616.38 (560.16)

## 5.2 Capítulo II - Classificação da infecção pelo vírus da leucemia felina, quantificação do DNA pró-viral e alterações hematológicas em gatos de um abrigo no Rio de Janeiro, Brasil.

Carla Regina Gomes Rodrigues Santos<sup>a</sup>, Grazielle Moraes de Rezende<sup>b</sup>, Julia Possebon<sup>a</sup> Santi, Renata Beranger<sup>c</sup>, Ricardo Mouta Borges de Medeiros<sup>d</sup>, Liliane Tavares de Faria Cavalcante<sup>d</sup>, André Felipe Andrade dos Santos<sup>d</sup> Heloisa Justen Moreira de Souza<sup>d</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Medicina e Cirurgia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, Brasil

<sup>b</sup>Veterinaria – Rio de Janeiro, Brasil

<sup>c</sup>Infectologista, Rio de Janeiro, Brasil

<sup>d</sup>Laboratório de Diversidade e Doenças Virais (LDDV), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

**Resumo:** A infecção pelo vírus da Leucemia viral Felina (FeLV) apresenta alta prevalência no Brasil. De um total de 115 gatos, 94 (81,74%) foram negativos e 21 (18,26%) positivos para o FeLV na pesquisa de antígeno no teste de triagem. Dos 21 gatos FeLV positivos, 8/21(38,1%) eram fêmeas, 13/21(61,9%) eram machos e 20/21 (95,23%) eram castrados. Os gatos FeLV positivos foram significativamente mais velhos que os gatos negativos para o vírus ( $p=0.003$ ), assim como, apresentaram menor escore corporal ( $p=0.009$ ). Na pesquisa para DNA pró-viral do FeLV foi detectável em 24 (20,87%) dos 115 gatos. O valor mínimo de detecção foi de 346 cópias/ $10^6$  células e o valor máximo de 46666734.93 cópias/ $10^6$  células. A análise do resultado pesquisa de DNA pró-viral e o teste de triagem para o FeLV identificou 19 (16,52%) gatos com infecção progressiva, 5 (4,35%) gatos com infecção regressiva e dois gatos com os resultados discordantes. O grupo de gatos positivo no teste de triagem para o FeLV apresentaram 169.1 vezes mais chance do desfecho detectável que o grupo negativo para o FeLV (OR 169.1; IC95% 26.34,1737.42). A quantificação de cópias de DNA pró-viral foi significativamente maior em gatos com infecção progressiva ( $p=0,009$ ) do que dos gatos com infecção regressiva. Os gatos positivos para o FeLV apresentaram os valores de RBC, HGB, HT significativamente menor com valores, respectivamente, de  $p < 0.001$ ,  $p = 0.001$  e  $p < 0.001$ , que o grupo de gatos FeLV negativo.

**Palavras-chaves:** retrovíroses, anemia, felino, gammaretrovírus.

**Abstract:** Feline viral leukemia virus (FeLV) infection is highly prevalent in Brazil. Of a total of 115 cats, 94 (81.74%) were negative and 21 (18.26%) positive for FeLV in the antigen search in the screening test. Of the 21 FeLV positive cats, 8/21(38.1%) were females, 13/21(61.9%) were males and 20/21 (95.23%) were neutered. FeLV-positive cats were significantly older than FeLV-negative cats ( $p=0.003$ ), as well as having a lower body score ( $p=0.009$ ). On screening for FeLV proviral DNA it was detectable in 24 (20.87%) of 115 cats. The minimum detection value was 346 copies/ $10^6$  cells and the maximum value was 46666734.93 copies/ $10^6$  cells. Analysis of the results of the proviral DNA test and the FeLV screening test identified 19 (16.52%) cats with progressive infection, 5 (4.35%) cats with regressive infection, and two cats with discordant results. The group of cats positive in the FeLV screening test were 169.1 times



more likely to have a detectable outcome than the FeLV negative group (OR 169.1; 95%CI 26.34,1737.42). The quantification of proviral DNA copies was significantly higher in cats with progressive infection ( $p=0.009$ ) than in cats with regressive infection. FeLV-positive cats had significantly lower RBC, HGB, HT values, with values of  $p < 0.001$ ,  $p = 0.001$  and  $p < 0.001$ , respectively, than the group of FeLV-negative cats.

Keywords: retroviruses, anemia, feline, gammaretrovirus.

## 1. Introdução

O FeLV é o retrovírus de maior impacto na clínica na medicina felina. Gatos em viremia eliminam constantemente milhões de partículas virais na saliva, o que faz dela a principal fonte de infecção e de fácil disseminação. O Brasil é um país de alta e crescente prevalência de infecção pelo FeLV. As prevalências descritas podem variar consideravelmente de acordo com a região estudada, e com a técnica de diagnóstico utilizada. Assim, há estudos publicados com 22,3%, 31% e até 47,5% de prevalência em regiões distintas [1,2,3].

Recentemente, a classificação quanto a infecção pelo Vírus da leucemia felina foi redefinida em infecção abortiva, regressiva e progressiva. Há um consenso após a exposição ao vírus, a curso da infecção depende da intensidade de pressão da viral, comorbidades, estado imunológico do gato e de um ambiente estressante [4,5,6].

A infecção progressiva é a condição de viremia persistente após exposição ao FeLV. Esses animais apresentam baixos níveis de anticorpos neutralizantes detectáveis e resultado positivo para qualquer teste diagnóstico realizado [4,7,8]. A infecção regressiva ocorre quando o sistema imune consegue frear a replicação viral, antes ou após a infecção da medula óssea. Durante todo o período de viremia o gato elimina o vírus e é fonte de infecção. Após contida a replicação viral, o gato deixa de ser infeccioso para outros animais e apresenta baixo risco de desenvolver doenças associadas ao FeLV. Esses animais não apresentam antigenemia, mas são positivos para DNA pró-viral e ou RNA viral [4,7,8,9].

Os sinais clínicos associados a infecção pelo FeLV são inúmeros como linfomas e leucemias, imunossupressão, doenças imunomediadas, neuropatias e desordens reprodutivas [7]. Além disso, são descritas algumas desordens hematológicas como a anemia regenerativa ou arregenerativa, neutropenia cíclica, trombocitopenia, anormalidade na função de plaquetas, aplasia medular e panleucopenia [10].

A qPCR e RT-qPCR são mais sensíveis para o diagnóstico desse status de infecção do que os demais testes laboratoriais disponíveis [11,12]. Atualmente, há esforços para encontrar uma correlação entre o número de cópias de DNA pró-viral do FeLV e o status de infecção.

Estes resultados podem auxiliar no manejo clínico e no prognóstico do paciente positivo para o vírus. O objetivo deste estudo foi diagnosticar e classificar a infecção pelo FeLV em uma população potencialmente exposta, quantificar o DNA pró-viral, descrever os achados hematológicos associados a infecção.

## **2. Material e métodos**

### **2.1 Estudo populacional**

O estudo foi realizado com gatos de um abrigo localizado no município do Rio de Janeiro, Brasil. Os procedimentos realizados no estudo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro protocolada sob a CEUA nº 9632171120. Um total de 115 gatos sem raça definida, independente de sexo, estado reprodutivo foram incluídos no estudo. Os gatos com menos de 3 meses de vida e vacinados contra leucemia foram excluídos do estudo. Os dados de identificação dos animais como o sexo, o estado reprodutivo, faixa etária [13] e escore corporal foram registrados para posterior análise estatística.

### **2.2 Coleta das amostras**

Os animais não foram submetidos a jejum prévio para coleta de sangue. A contenção física para coleta da amostra foi com o emprego da técnica Cat Friendly Practice® (Taylor 2022). A coleta de sangue foi realizada pela punção da veia cefálica ou femoral medial. O volume total de 5 mL de sangue foi distribuído em três tubos contendo etilenodiamino tetra-ácido (EDTA). Cada tubo foi direcionado para uma análise laboratorial distinta.

### **2.3 Teste de triagem para o FIV e FeLV.**

O teste de triagem comercial ALERE FIV Ac/FeLV Ag Test Kit (imunocromatografia de fluxo lateral unidirecional) foi utilizado em todos os animais para pesquisa do antígeno p27 e anticorpos para o FIV. A amostra utilizada para realização do teste foi de sangue total e seguiu as instruções do fabricante.

### **2.4 Análise hematológica**

O hemograma foi realizado no mesmo dia da coleta. A técnica de contagem celular global foi realizada pelo analisador hematológico CELL-DYN 3700, com a avaliação citológica pela microscopia óptica.

## **2.5 Análise quantitativa por reação em cadeia da polimerase de DNA pró-viral do FeLV (qPCR)**

As amostras direcionadas a qPCR de DNA pró-viral do FeLV foram processadas e armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Para a realização da curva padrão da reação de PCR quantitativo (qPCR), um plasmídeo foi sintetizado pela empresa FASTBIO (Ribeirão Preto, SP, Brasil). Foi utilizado o vetor pUC57 com inserção de sequências dos seguintes alvos da qPCR: região LTR de FeLV e o gene do receptor C-C de quimiocina 5 felino (fCCR5). Esse plasmídeo foi clonado através de choque térmico em bactérias *Escherichia coli* da cepa dh5 alfa. Foi utilizado o QIAGEN Plasmid Midi Kit (QIAGEN Inc, Valencia, CA, USA) para realizar a extração do DNA plasmidial, que foi quantificado utilizando um fluorômetro Qubit 2.0 (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, USA).

A análise de qPCR foi realizada no Laboratório de Diversidades e Doenças Virais (LDDV) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Aproximadamente 2 mL de sangue foram processados através de centrifugação por 15 minutos a 10.000 Xg para fracionamento em plasma, camada leucoplaquetária e sangue total. O DNA genômico (DNAg) foi extraído da camada leucoplaquetária com o Pure Link® Genomic DNA Kit (INVITROGEN, Carlsbad, CA, USA). A integridade das amostras de DNA foi verificada por através de reações de PCR convencional que tinham como alvo o gene mitocondrial citocromo B, com iniciadores e condições descritas por Naidu et al. (2012) [14]. A quantificação de DNAg foi realizada pelo Nanodrop NanoVuePlus™ (GE HEALTHCARE). Iniciadores e sondas descritos por Powers et al. (2018) foram utilizados na quantificação da sequência LTR de FeLV e do gene fCCR5. A quantificação absoluta do número de cópias de LTR e CCR5 foi mensurada em uma máquina 7500 Fast Real-Time PCR system (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, USA) utilizando como curva padrão diluições seriadas do plasmídeo ( $10^3$  -  $10^{10}$  cópias). O número de células foi calculado através da quantificação absoluta do número de cópias do gene CCR5 que possui duas cópias por genoma felino. A carga pró-viral foi calculada através da razão entre o número de cópias de LTR e número de células.

## **3. Análise estatística**

Foi adotado neste trabalho a significância de 5%. P-valores menores que 5% serão considerados significantes e destacados com um \* (significante a 5%). Dois asteriscos (\*\*) indicam significância a 1% e três (\*\*\*) indicam significância a 0,1%. A análise descritiva foi realizada com cálculos de frequência relativa para as variáveis categóricas e cálculo de medidas

de centralidade e dispersão das variáveis numéricas (mínimo, máximo, média, mediana, desvio padrão e quartis). Os testes estatísticos paramétricos e não paramétricos foram utilizados de acordo com o teste de normalidade das variáveis como o Teste de Shapiro-Wilk; Teste t; Mann-Whitney; Anova one-way; Teste HSD de Tukey; Kruskal-Wallis; Teste de Dunn; Teste Chi-Quadrado; e Teste Exato de Fisher. Foi calculada a razão de chance, bem como o intervalo de confiança para entender os fatores de risco, acompanhada pelo p-valor correspondente. As presentes análises foram feitas através do software livre R (R version 4.1.1 (2021-08-10)). R Core Team (2021). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL [HTTPS://WWW.R-PROJECT.ORG/](https://www.R-project.org/).

#### 4. Resultados

De um total de 115 gatos, 94 (81,74%) foram negativos e 21 (18,26%) positivos para o FeLV na pesquisa de antígeno no teste de triagem. Os gatos negativos para o FIV e o FeLV foram 54(46,96%), positivos apenas para o FIV foram 40 (34,78%) e 11(9,6%) eram co-infectados.

Dos 21 gatos FeLV positivos, 8/21(38,1%) eram fêmeas, 13/21(61,9%) eram machos e 20/21 (95,23%) eram castrados. Não foi encontrada associação significativa entre sexo, estado reprodutivo e o status positivo para o FeLV. Mais da metade dos gatos FeLV positivos tinham entre 1 e 6 anos de idade, e tiveram gatos FeLV positivo em todos os estágios de vida. Os gatos FeLV positivos foram significativamente mais velhos que os gatos negativos para o vírus ( $p=0.003$ ), assim como, apresentaram menor escore corporal ( $p=0.009$ ) (Tabela 1). Ainda, a análise de regressão logística identificou que a cada um ponto no aumento do escore corporal reduz a chance em 52,8% do gato ser FeLV positivo (OR 0.472; IC95% 0.29, 0.768);  $p=0,003$ ). E que os gatos entre 1 a 6 anos de idade tiveram 11 vezes mais chance de ser FeLV positivo (OR 11.432; IC95% (1.704, 76.691);  $p=0,012$ ) comparado com gatos mais jovens.

A pesquisa para DNA pró-viral do FeLV foi detectável em 24 (20,87%) dos 115 gatos. O valor mínimo de detecção foi de 346 cópias/ $10^6$  células e o valor máximo de 46666734.93 cópias/ $10^6$  células. A análise do resultado pesquisa de DNA pró-viral e o teste de triagem para o FeLV identificou 19 (16,52%) gatos com infecção progressiva, 5 (4,35%) gatos com infecção regressiva e dois gatos com os resultados discordantes. Oitenta e nove animais foram negativos em ambos os testes de diagnóstico. Dos 21 gatos positivos no exame de triagem, 19(90,48%) gatos tiveram o DNA pró-viral detectado no exame da PCR. Houve uma associação

significativa entre o resultado positivo no teste de triagem e DNA pró-viral detectável. O grupo de gatos positivo no teste de triagem para o FeLV apresentaram 169.1 vezes mais chance do desfecho detectável que o grupo negativo para o FeLV (OR 169.1; IC95% 26.34,1737.42).

Entre o grupo de gatos com infecção progressiva e regressiva as variáveis de sexo, estado reprodutivo, status de FIV positivo e faixa etária não foi encontrada associação significativa. No entanto, a quantificação de cópias de DNA pró-viral foi significativamente maior em gatos com infecção progressiva ( $p=0,009$ ) do que dos gatos com infecção regressiva (Tabela 2).

A análise hematológica dos gatos positivos para o FeLV os principais achados foram a anemia, trombocitopenia, leucopenia e leucocitose, neutrofilia e neutropenia, linfopenia e linfocitose, monocitose e eosinopenia. Os gatos positivos para o FeLV apresentaram os valores de RBC, HGB, HT significativamente menor com valores, respectivamente, de  $p < 0.001$ ,  $p = 0.001$  e  $p < 0.001$ , que o grupo de gatos FeLV negativo (tabela 3). No entanto, o valor da média destas variáveis permaneceu dentro do intervalo de referência para a espécie. Além disso, os gatos positivos para o FeLV apresentaram a valor de bastões ( $p=0.002$ ) e linfócitos ( $p=0.019$ ). A regressão logística identificou que a cada aumento em 1 unidade da variável RCB diminui 82% a chance de o gato ser FeLV positivo (OR IC 95%; IC 95% 0,178 (0.042, 0,761);  $p=0.020$ ).

Entre os gatos com infecção progressiva e regressiva para o FeLV, os gatos com infecção progressiva apresentaram o HGB e HCT estatisticamente menor com valor respectivo de  $p=0.033$  e  $p=0.027$ . A monocitose foi um achado estatisticamente significativo em gatos com infecção progressiva ( $p=0.031$ ).

Um total de 15/19 (78.95%) gatos com infecção progressiva morreram durante o estudo. O desfecho de óbito foi significativamente associado ao grupo de gatos com infecção progressiva ( $p=0.003$ ). Nenhum dos cinco gatos com infecção regressiva morreu durante o período de observação do estudo.

## 5. Discussão

A prevalência da infecção pelo FeLV no abrigo foi de 18,26% para infecção pelo FeLV e 9,6% para ambos os retrovírus utilizado a pesquisa de antígeno p27 em sangue total para o diagnóstico. Este resultado vai de encontro com estudos recentes de prevalência no país, onde foi descrita a prevalência de 28.41% em uma população potencialmente exposta, e a prevalência de 47.7% de em gatos com sinais clínicos suspeitos a infecção [2,3]. O resultado encontrado

aqui desto a da prevalência de países conseguiram controlar a taxa de infecção como o Canadá e Estados Unidos com a prevalência de torno de [15]. Um recente estudo realizado em um centro médico de referência na Florida (EUA), de 2002 gatos testados com sinais clínicos suspeitos da infecção pelo FeLV apenas 2% dos animais foram positivos [16,17]

Apesar da utilização de técnicas diferentes para o diagnóstico, um estudo anterior com 1094 gatos, na mesma região do presente estudo, encontrou 11.52% de gatos positivos para a infecção pelo FeLV [17]. A utilização de gatos de um abrigo, de uma amostra potencialmente exposta ao vírus, não minimiza a gravidade do resultado encontrado. Um estudo realizado em dois abrigos distintos para identificar a prevalência e fatores de risco para infecção para o FeLV no Reino Unido identificou a prevalência de 3% (4/473) e 2 gatos coinfetados, e o segundo 0/135 [18]. Além disso, a infecção pelo vírus está associada a doenças graves e fatais como neoplasias e desordens hematológicas e infecções oportunistas [7,10]. Gatos infectados com o FeLV tem 62x mais chance de desenvolverem linfoma ou leucemia do que gatos não infectados [6].

Os gatos machos, não castrados, com acesso a área externa foram descritos como fator de risco para infecção pelo FeLV [2,17]. Diferentemente, neste estudo não foi encontrada associação significativa entre sexo, estado reprodutivo e o status positivo para o FeLV. Os gatos FeLV positivo mais velhos foram significativamente mais velhos os gatos negativos. Os gatos entre 1 a 6 anos de idade apresentaram 11 vezes mais chance de ser FeLV. Gatos mais velhos, com idade entre 1 e 5 anos e a coabitação com numerosos animais representaram fator de risco anteriormente [17]. O escore corporal é uma variável já analisada e associada a infecção pelo FeLV em estudo outro clínico realizado com gatos de abrigo. E o resultado foi semelhante ao encontrado, com o baixo escore corporal representou um fator de risco para a infecção pelo FeLV, e cada um ponto no aumento do escore corporal reduziu a chance em 52,8% do gato ser FeLV positivo [18].

O método de diagnóstico para a infecção pelo FeLV modifica a prevalência do vírus na população estudada [1]. Os testes qPCR e RT-qPCR são mais sensíveis para o diagnóstico desse status de infecção do que os demais testes [11,12]. Isso ocorre porque com o uso da técnica molecular é possível identificar gatos com infecção progressiva e regressiva. O diagnóstico de gatos positivos com infecção regressiva assume total importância devido a possibilidade de reativação viral [19,20]. O uso da técnica molecular aumenta o diagnóstico da infecção. Na pesquisa para DNA pró-viral do FeLV foi detectável em 24 (20.87%) dos 115 gatos, maior a prevalência do diagnóstico com base no teste de triagem.

A análise do resultado pesquisa de DNA pró-viral e o teste de triagem para o FeLV identificou 19 (16,52%) gatos com infecção progressiva, 5 (4,35%) gatos com infecção regressiva. Experimentalmente, em ambiente laboratorial controlado, a taxa estimada de infecção abortiva é de 20-30%, de infecção progressiva é de 30-40% e de infecção regressiva é de 30-40%. No entanto, isso pode não representar a realidade de gatos expostos naturalmente ao vírus. E a razão pela qual cada gato irá desenvolver um tipo de infecção após exposição ao vírus não é completamente conhecida [4,5].

Um estudo que incluiu 115 gatos, expostos naturalmente ao FeLV, foi examinada a resposta imune humoral com novo teste ELISA. Este teste mede os anticorpos que reconhecem da unidade da glicoproteína de superfície FeLV (SU) em amostras de plasma. Uma correlação foi demonstrada entre a força da resposta imune humoral à proteína SU e o resultado da exposição. Gatos com infecção regressiva demonstraram maiores respostas de anticorpos à proteína SU. Esse resultado demonstra que este teste pode complementar o uso de testes de diagnóstico viral para definir o resultado da exposição para FeLV. Juntos, esses testes podem permitir a identificação rápida de gatos com infecção regressiva que são improváveis de desenvolver doença relacionada ao FeLV [21].

Os gatos do presente estudo com o antígeno positivo tiveram 169 vezes mais chances de apresentar o teste de qPCR para o DNA pró-viral positivo. O uso do teste de qPCR para detecção de DNA pró-viral em associação ao ELISA para pesquisa de antígeno p27 apresentam 100% de sensibilidade para o diagnóstico da infecção [11,22,23]. A relação linear entre os exames para pesquisa de qPCR RNA viral e DNA é significativamente forte [12]. Já a associação do resultado do teste ELISA para detecção do antígeno p27 é maior com o resultado do exame da qPCR DNA pró-viral que para a qPCR RNA viral [22]. No entanto, dois gatos tiveram o resultado discordante, foram positivos apenas para antígeno. Resultado semelhante ocorreu em uma pesquisa onde de 41 gatos tiveram antígeno positiva e em 3 destes o RNA viral não foi detectável [22].

Entre o grupo de gatos com infecção progressiva e regressiva as variáveis de sexo, estado reprodutivo, status de FIV positivo e faixa etária não foi encontrada associação significativa. Na literatura não há dados com os mesmos efeitos comparativos entre os dois estágios de infecção.

A infecção regressiva ocorre quando o sistema imune consegue frear a viremia, replicação viral, antes ou pouco após a infecção da medula óssea. Durante todo o período de

viremia o gato elimina o vírus e é fonte de infecção. Após contida a replicação viral, não ocorre mais a eliminação do vírus e o gato deixa de ser infeccioso para outros animais. Esses gatos apresentam baixo risco de desenvolver doenças associadas ao FeLV, embora haja integração do vírus ao seu genoma. Esses animais apresentam o teste de triagem para pesquisa de antígeno negativo e PCR para DNA pró-viral positivo [5,7,9,24]. No presente estudo cinco gatos foram identificados com infecção regressiva. Durante o período de realização do estudo 78.95% gatos com infecção progressiva morreram. Este resultado foi estatisticamente significativo em comparação ao desfecho do grupo de gatos regressivos. Uma análise de 20 gatos infectados experimentalmente com infecção progressiva revelou uma tempo médio de sobrevivência de 3,1 anos (variando de 0,6 a 6,5 anos) [19]. No presente estudo, não houve óbito no grupo de gatos com infecção regressiva, mas a reativação viral já foi descrita 8 anos após a infecção inicial [19].

Em um estudo experimental que acompanhou durante anos a evolução da infecção pelo FeLV notou que cargas maiores foram encontradas em gatos virêmicos, independentemente de seu estado de saúde. E notavelmente, gatos com infecção regressiva mostraram provírus detectável e cargas de RNA viral em vários tecidos, mesmo após 12 anos após a exposição ao vírus. A reativação foi observada em vários animais, assim, conclui-se que o retrovírus integrado como provírus no genoma do hospedeiro, não pode ser completamente eliminado. Isto demonstra o potencial de replicação e reativação viral do FeLV [19].

O valor mínimo de detecção foi de  $3,4 \times 10^2$  cópias/ $10^6$  células e o valor máximo de  $4,6 \times 10^9$  cópias/ $10^6$  células. A quantificação de cópias de DNA pró-viral foi significativamente maior em gatos com infecção progressiva assim como estudos anteriores [19,26,27,28]. A carga viral de RNA e a carga de pró-viral DNA são importantes parâmetros de avaliação de progressão da infecção. Em gatos naturalmente infectados com antigenemia, a presença de DNA pró-viral sempre pode ser confirmada, enquanto alguns gatos são negativos para RNA plasmático. Os resultados negativos podem ser atribuídos à diferença no limite de detecção entre os dois ensaios. Uma segunda possível explicação para os resultados verdadeiros negativos do plasma de RNA viral na presença do pró-vírus FeLV nas mesmas amostras pode ser encontrada na biologia da infecção por FeLV. Gatos com infecção regressiva; eles superam a viremia aguda e apenas o provírus pode ser encontrado, mas não vírus ou antígeno. Um importante estudo sobre o curso da infecção pelo FeLV identificou na qPCR DNA pró-viral o valor mínimo e máximo, respectivamente, de 65 cópias e  $4,7 \times 10^9$  cópias/ $10^6$  células [22].



Há a hipótese de que os diferentes resultados da infecção pode estar causalmente ligado ao RNA viral e cargas de provírus dentro do hospedeiro. Atualmente, o uso da quantificação de DNA pró-viral para o FeLV tem sido utilizado na rotina clínica para auxiliar na terapia antirretroviral e no prognóstico do paciente [26,29,30]. Em 2019, foi publicado o primeiro estudo que através da titulação do antígeno p27 e a quantificação de DNA pró-viral objetivou-se classificar o curso da infecção pelo FeLV. Dos 353 gatos, gatos com quantificação de DNA pró-viral maior ou igual a  $1 \times 10^6$  e mais de 30ng/mL de concentração de p27 teriam supostamente a infecção progressiva. E os gatos com o valor menor que  $1 \times 10^6$  cópias de DNA pró-viral por mL e titulação de antígeno p27 menor que  $< 10\text{ng/mL}$  a infecção regressiva [27]. No entanto, houve limitação do estudo devido a ausência e possível correlação com os dados clínicos.

Um estudo prospectivo estabeleceu os valores de corte para concentração de antígeno p27 e carga de DNA proviral para distinguir gatos progressivos de regressivos e ainda, de alto positivo e de baixa positividade. Além disso, estes valores foram correlacionados a sobrevida dos animais. Gatos altamente positivos tiveram uma sobrevida média de 1,37 anos e os com baixa contagem de DNA pró-viral tiveram 93,1% de sobrevivência em 4 anos de estudo. Os gatos com alta positividade tiveram a titulação de p27  $> 37,5 \text{ ng/mL}$  e a contagem de DNA pró-viral maior que  $4.0 \times 10^5/\text{mL}$  de sangue. Esses resultados fornecem um novo suporte para a implementação prática de diretrizes internacionais e otimizam o manejo de gatos infectados e não infectados [26,29].

Como encontrado no presente trabalho, as citopenias são alterações hematológicas comuns em gatos FeLV positivos [31-35]. Os principais achados dos gatos FeLV positivo foram a anemia, trombocitopenia, leucopenia neutropenia, linfopenia e a eosinopenia. As diferenças da cepa viral, sua patogenicidade ou estágio clínico da doença podem explicar alguns achados discordantes. Além disso, exames conduzidos em animais experimentalmente infectados podem não refletir situações da infecção natural [33]. O aumento de leucócitos, neutrófilos, linfócitos e monócitos foi um achado em alguns gatos FeLV positivos. E a contagem de linfócitos acima do valor de referência também foi o achado mais observado em gatos FeLV-positivo comparado ao grupo controle de gatos negativos [33].

A infecção pelo FeLV pode levar ao desenvolvimento da anemia por vários fatores. Os gatos infectados com o subgrupo C desenvolvem hipoplasia eritróide grave. A infecção de doença crônica, devido a infecções concomitantes ou neoplasia, com conseqüente anormalidades no uso de ferro e sobrevivência de hemácias é outra mecanismo que causa

anemia não regenerativa em infectados por FeLV gatos. A anemia regenerativa é menos comum e pode estar relacionada com perda de sangue ou hemólise secundária a infecção por hemoplasma ou doença imunomediada [5,7,9,33]. A anemia foi uma alteração significativa no presente estudo, e o aumento em 1 unidade da variável RCB diminui 82% a chance do gato ser FeLV positivo. Os gatos com infecção progressiva apresentaram o hematócrito estatisticamente menor que os gatos com infecção regressiva. Em um estudo de 24 de 31 gatos apresentaram no mínimo a anemia como alterações hematológicas associadas ao FeLV [35]. Mesmo em uma região com apenas 2% de prevalência de infecção pelo FeLV, a anormalidade mais encontrada foi a anemia em 71% dos casos [32].

Gatos com citopenias sanguíneas periféricas inexplicadas podem ser positivos para infecção pelo FeLV. Mas, dados anteriores descrevem que até 22,5% dos gatos com alguma citopenia eram negativos para antigenemia. Isto indica que a negatividade para o antígeno FeLV não pode descartar a infecção. E ainda, sugere-se que a latência de FeLV é rara em gatos com doença não regenerativa citopenias, com apenas 5,4% dos gatos com citopenias tem associação ao diagnóstico da infecção latente pelo FeLV [10].

## 6. Conclusão

A associação de técnicas de diagnóstico para o FeLV além de aumentar a prevalência na população permite a classificar a infecção. A classificação da infecção, bem como a quantificação do DNA pró-viral é um importante parâmetro de acompanhamento clínico. Alterações hematológicas na série vermelha apresenta uma forte associação com a infecção pelo FeLV.

## 7. Referências bibliográficas

- [1] COELHO, F. M. et al. Ocorrência do vírus da leucemia felina em *Felis catus* em Belo Horizonte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, p. 778-783, 2011.
- [2] Biezus G, Machado G, Ferian PE, et al. Prevalence of and factors associated with feline leukemia virus (FeLV) and feline immunodeficiency virus (FIV) in cats of the state of Santa Catarina, Brazil. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2019;63:17-21.
- [3] DA COSTA, Fernanda VA et al. Hematological findings and factors associated with feline leukemia virus (FeLV) and feline immunodeficiency virus (FIV) positivity in cats from southern Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 37, p. 1531-1536, 2017.

- [4] Little, S., Levy, J., Hartmann, K., Hofmann-Lehmann, R., Hosie, M., Olah, G., & Denis, K. S. (2020). 2020 AAFP Feline Retrovirus Testing and Management Guidelines. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 22(1), 5–30.
- [5] Hartmann K. Clinical aspects of feline retroviruses: a review. *Viruses*. 2012;4(11):2684-2710.
- [6] WESTMAN, M. E.; MALIK, R.; NORRIS, J. M. Diagnosing feline immunodeficiency virus (FIV) and feline leukaemia virus (FeLV) infection: an update for clinicians. **Australian veterinary journal**, v. 97, n. 3, p. 47-55, 2019
- [7] HARTMANN, K. Infecção pelo Vírus da Leucemia Felina. In: GREENE, C. E. **Doenças Infecciosas em Cães e Gatos**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015. p. 113-143.
- [8] HARTMANN, Katrin; HOFMANN-LEHMANN, Regina. What's New in Feline Leukemia Virus Infection. **The Veterinary clinics of North America. Small animal practice**, p. S0195-5616 (20) 30046-2, 2020.
- [9] HARTMANN, K. Regressive and progressive feline leukemia virus infections—clinical relevance and implications for prevention and treatment. **Thai Journal of Veterinary Medicine Supplement**, v. 47, p. S109-S112, 2017.
- [10] Stützer, B., et al. "Role of latent feline leukemia virus infection in nonregenerative cytopenias of cats." *Journal of veterinary internal medicine* 24.1 (2010): 192-197.
- [11] CATTORI, Valentino et al. Real-time PCR investigation of feline leukemia virus proviral and viral RNA loads in leukocyte subsets. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 123, n. 1-2, p. 124-128, 2008.
- [12] TORRES, Andrea N. et al. Development and application of a quantitative real-time PCR assay to detect feline leukemia virus RNA. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 123, n. 1-2, p. 81-89, 2008.
- [13] QUIMBY, Jessica et al. 2021 AAHA/AAFP feline life stage guidelines. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 23, n. 3, p. 211-233, 2021.
- [14] Naidu, Ashwin, et al. "Novel primers for complete mitochondrial cytochrome b gene sequencing in mammals." *Molecular Ecology Resources* 12.2 (2012): 191-196.

- [15] Burling, Amie N., et al. "Seroprevalences of feline leukemia virus and feline immunodeficiency virus infection in cats in the United States and Canada and risk factors for seropositivity." *Journal of the American Veterinary Medical Association* 251.2 (2017): 187-194.
- [16] Pare, Amelie, Alexandre Ellis, and Tristan Juette. "Clinicopathological findings of FeLV-positive cats at a secondary referral center in Florida, USA (2008–2019)." *Plos one* 17.4 (2022): e0266621.
- [17] de Almeida, Nadia R., et al. "Prevalence of feline leukemia virus infection in domestic cats in Rio de Janeiro." *Journal of feline medicine and surgery* 14.8 (2012): 583-586.
- [18] Stavisky J, Dean RS, Molloy MH. Prevalence of and risk factors for FIV and FeLV infection in two shelters in the United Kingdom (2011-2012). *Vet Rec.* 2017;181(17):451.
- [19] HELFER-HUNGERBUEHLER, A. Katrin et al. Long-term follow up of feline leukemia virus infection and characterization of viral RNA loads using molecular methods in tissues of cats with different infection outcomes. **Virus research**, v. 197, p. 137-150, 2015.
- [20] NESINA, Stefanie et al. Retroviral DNA—the silent winner: blood transfusion containing latent feline leukemia provirus causes infection and disease in naïve recipient cats. **Retrovirology**, v. 12, n. 1, p. 105, 2015.
- [21] Parr, Yasmin A., et al. "Measuring the humoral immune response in cats exposed to feline leukaemia virus." *Viruses* 13.3 (2021): 428.
- [22] Tandon, Ravi, et al. "Quantitation of feline leukaemia virus viral and proviral loads by TaqMan® real-time polymerase chain reaction." *Journal of virological methods* 130.1-2 (2005): 124-132.
- [23] Hofmann-Lehmann, Regina, et al. "Feline leukaemia provirus load during the course of experimental infection and in naturally infected cats." *Journal of General Virology* 82.7 (2001): 1589-1596.
- [24] Hofmann-Lehmann, Regina, and Katrin Hartmann. "Feline leukaemia virus infection: A practical approach to diagnosis." *Journal of feline medicine and surgery* 22.9 (2020): 831-846.

- [25] Hofmann-Lehmann, Regina, and Katrin Hartmann. "Feline leukaemia virus infection: A practical approach to diagnosis." *Journal of feline medicine and surgery* 22.9 (2020): 831-846.
- [26] Beall, Melissa J., et al. "Feline leukemia virus p27 antigen concentration and proviral DNA load are associated with survival in naturally infected cats." *Viruses* 13.2 (2021): 302.
- [27] Beall, Melissa J., et al. "Evaluation of a quantitative enzyme-linked immunosorbent assay for feline leukemia virus p27 antigen and comparison to proviral DNA loads by real-time polymerase chain reaction." *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 67 (2019): 101348.
- [28] Duda, Naila CB, et al. "Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases." *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 71 (2020): 101491.
- [29] Santos, Carla Regina Gomes Rodrigues, et al. "Undetectable proviral DNA and viral RNA levels after raltegravir administration in two cats with natural feline leukemia virus infection." *Brazilian Journal of Veterinary Medicine* 44 (2022): e003522-e003522.
- [30] Boesch, Andrea, et al. "Evaluation of the effect of short-term treatment with the integrase inhibitor raltegravir (Isentress™) on the course of progressive feline leukemia virus infection." *Veterinary microbiology* 175.2-4 (2015): 167-178.
- [31] Stavroulaki EM, Mylonakis ME, Papanikolaou E, Hatzis A, Xenoulis PG. Steroid-responsive neutropenia in a cat with progressive feline leukemia virus infection. *Vet Clin Pathol.* 2020 Sep;49(3):389-393.
- [32] Pare A, Ellis A, Juette T. Clinicopathological findings of FeLV- positive cats at a secondary referral center in Florida, USA (2008-2019). *PLoS One.* 2022;17(4):e0266621.
- [33] Gleich S, Hartmann K. Hematology and serum biochemistry of feline immunodeficiency virus-infected and feline leukemia virus-infected cats. *J Vet Intern Med.* 2009;23(3):552-558.
- [34] Stützer B, Müller F, Majzoub M, et al. Role of latent feline leukemia virus infection in nonregenerative cytopenias of cats. *J Vet Intern Med.* 2010;24(1):192-197.

[35] Abdollahi-Pirbazari M, Jamshidi S, Nassiri SM, Zamani-Ahmadm Mahmudi M. Comparative measurement of FeLV load in hemolymphatic tissues of cats with hematologic cytopenias. *BMC Vet Res.* 2019;15(1):460.

Tabela 1. Resultado da análise do resultado do teste de triagem (POC) de 75 gatos divididos em dois grupos de acordo com o resultado do teste de triagem para antigenemia para o feLV e exclusão dos gatos com resultado positivo para anticorpos contra o FIV.

<b>Característica</b>	<b>Geral</b>	<b>Felv Positivo</b>	<b>Felv Negativo</b>	<b>p-valor</b>
<b>Sexo (75)</b>				
F	43	8 (18.6%)	35 (81.4%)	0.066a (v=0.24)
M	32	13 (40.62%)	19 (59.38%)	
<b>Est. Rep (75)</b>				
C	61	20 (32.79%)	41 (67.21%)	0.095b
Inteiro	14	1 (7.14%)	13 (92.86%)	
<b>Faixa ET (75)</b>				
0 a 1 ano	33 (44%)	3 (14.29%)	30 (55.56%)	0.003**d (r=-0.34)
1 a 6 anos	30 (40%)	13 (61.9%)	17 (31.48%)	
7 a 10 anos	9 (12%)	4 (19.05%)	5 (9.26%)	
11 anos ou mais	3 (4%)	1 (4.76%)	2 (3.7%)	
<b>Escore corporal (75)</b>				
1	1 (1.33%)	0 (0%)	1 (1.85%)	0.009**d (r=0.3)
2	2 (2.67%)	2 (9.52%)	0 (0%)	
3	2 (2.67%)	1 (4.76%)	1 (1.85%)	
4	12 (16%)	7 (33.33%)	5 (9.26%)	
5	19 (25.33%)	4 (19.05%)	15 (27.78%)	
6	26 (34.67%)	5 (23.81%)	21 (38.89%)	
7	13 (17.33%)	2 (9.52%)	11 (20.37%)	

Tabela 2. Resultado da quantificação do número de cópias de DNA pró-viral/ $10^6$  células dos gatos com infecção progressiva e regressiva pelo FeLV.

Identificação	Classificação da infecção	Valor da PCR
gato 23	Progressiva	$5,9 \times 10^4$
gato 26	Progressiva	$1,1 \times 10^6$
gato 27	Progressiva	$8,0 \times 10^6$
gato 59	Progressiva	$6,0 \times 10^6$
gato 94	Progressiva	$1,4 \times 10^6$
gato 99	Progressiva	$1,7 \times 10^6$
gato 100	Progressiva	$2,9 \times 10^6$
gato 101	Progressiva	$4,6 \times 10^7$
gato 102	Progressiva	$3,9 \times 10^5$
gato 107	Progressiva	$9,3 \times 10^5$
gato 12	Progressiva	$2,7 \times 10^4$
gato 22	Progressiva	$4,5 \times 10^3$
gato 24	Progressiva	$3,3 \times 10^6$
gato 28	Progressiva	$3,6 \times 10^6$
gato 29	Progressiva	$5,8 \times 10^4$
gato 30	Progressiva	$1,0 \times 10^4$
gato 31	Progressiva	$4,9 \times 10^4$
gato 32	Progressiva	$1,9 \times 10^3$
gato 44	Progressiva	$5,1 \times 10^5$
gato 95	Regressiva	$3,4 \times 10^2$
gato 67	Regressiva	$1,1 \times 10^3$
gato 115	Regressiva	$5,4 \times 10^3$
gato 49	Regressiva	$1,9 \times 10^4$
gato 18	Regressiva	$6,3 \times 10^4$



Tabela 3. Resultado dos parâmetros hematológicos de acordo com a análise do resultado do teste de triagem (POC) de 75 gatos divididos em dois grupos de acordo com o resultado do teste de triagem para antigenemia para o FeLV e exclusão dos gatos com resultado positivo para anticorpos contra o FIV.

<b>Característica</b>	<b>Felv Positivo</b>	<b>Felv Negativo</b>	<b>p-valor</b>
<b>RBC (x10<sup>6</sup>/μL) (75)</b>			
Min-Máx	3.3-8.58	6.26-10.38	<0.001***c (d=-1.22)
Média	6.69	8.02	
DP	1.23	0.93	
<b>HGB(g/dL) (75)</b>			
Min-Máx	5.7-13.2	8.79-14.1	0.001**c (d=-0.95)
Média	9.65	11.1	
DP	1.7	1.31	
<b>HCT (H%) (75)</b>			
Min-Máx	17-40	27.5-44.5	<0.001***c (d=-1)
Média	29.84	34.59	
DP	5.25	4.14	
<b>PLT (75)</b>			
Min-Máx	31800-735000	200000-644000	0.719d (r=0.04)
Média	289704.76	289951.85	
DP	143484.3	96247.38	
<b>WBC (x 10<sup>3</sup>/μL) (75)</b>			
Min-Máx	3180-166600	6720-39200	0.386d (r=0.1)
Média	20603.81	15518.52	
DP	34004.31	6283.87	
<b>Band neutrophils (75)</b>			
Min-Máx	0-322	0-194	0.002**d (r=-0.36)
Média	48.86	5.76	
DP	90.34	30.57	
<b>Neutrófilos segmentados (75)</b>			
Min-Máx	890-16240	3911-24304	0.773d (r=0.03)
Média	9118	9871.85	
DP	4439.74	4584.55	
<b>Eosinófilos (75)</b>			
Min-Máx	0-2530	0-2910	0.088d (r=0.2)
Média	685.48	869.72	

DP	666.88	559.55	
<b>Linfócitos (75)</b>			
Min-Máx	442-14168	712-14732	0.019*d (r=0.27)
Média	2979.62	4232.7	
DP	2749.93	2994.65	
<b>Monócitos (75)</b>			
Min-Máx	131-1736	67-2352	0.313d (r=-0.12)
Média	601.81	538.24	
DP	389.61	451.29	

Valores de referência: RBC 5 a 10 (x10<sup>6</sup>/μL); HGB 8 a 15 (g/dL); 24 – 45 HCT (H%); Plaqueta: 200000 – 800000; WBC 5500 – 19500 (x 10<sup>3</sup>/μL); Bastões 0 -300; Neutrófilos segmentados 2500 – 13000; Eosinófilos 110 – 1500; Linfócitos 1100 – 9000; Monócitos 55 - 780

## 6. CONCLUSÕES GERAIS

O presente estudo foi realizado com a população de um único abrigo. Inicialmente, este parece ser um fator de limitação do estudo. E a prevalência das retroviroses encontrada aqui pode não ser representativa dos demais abrigos da mesma região. No entanto, é importante ressaltar que há poucos estudos desenvolvidos e publicados para efeito comparativo. Assim, resultado aqui descrito colabora em incentivar o estudo de mais abrigos na região. E ainda, estimular o desenvolvimento e crescimentos da medicina de abrigo na região.

Outra consideração notável, é a importância não só do diagnóstico, mais também da classificação da infecção e quantificação de DNA pró-viral na rotina clínica da medicina felina. A classificação de gatos com infecção progressiva e regressiva com base na quantificação de DNA pró-viral tem um papel importante no acompanhamento clínico, bem como no prognóstico do paciente. Atualmente, o uso de antirretrovirais tem sido empregado com a tentativa de reduzir a replicação viral. E a quantificação do DNA pró-viral é o parâmetro laboratorial de acompanhamento terapêutico.

Durante o desenvolvimento desta tese, os parâmetros clínicos estudados aqui serviram de incentivo e base técnica para a publicação de um artigo científico. Este teve como objetivo o acompanhamento da carga de DNA pró-viral em dois gatos sob o uso de antirretroviral para o controle da infecção pelo FeLV (ANEXO V).

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDOLLAHI-PIRBAZARI, M. *et al.* Comparative measurement of FeLV load in hemolymphatic tissues of cats with hematologic cytopenias. **BMC Veterinary Research**, v. 15, n. 1, p. 460, 2019.

AMMERSBACH, M.; LITTLE, S.; BIENZLE, D. Preliminary evaluation of a quantitative polymerase chain reaction assay for diagnosis of feline immunodeficiency virus infection. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 15, p. 725–729, 2013.

ANDERSEN, P. R.; TYRRELL, P. Feline immunodeficiency virus diagnosis after vaccination. **Animal Health Research Reviews**, v. 5, n. 2, p. 327-330, 2004.

BARROS, V. R. *et al.* Epidemiology of feline immunodeficiency virus and feline leukemia virus in a veterinary teaching hospital. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 11, n. 2, p. 151-160, 2017.

BEALL, M. J. *et al.* Evaluation of a quantitative enzyme-linked immunosorbent assay for feline leukemia virus p27 antigen and comparison to proviral DNA loads by real-time polymerase chain reaction. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, v. 67, p. 1-5, 2019.

BEATTY, J. A. *et al.* Markers of feline leukaemia virus infection or exposure in cats from a region of low seroprevalence. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 13, n. 12, p. 927-933, 2011.

BISSET, L. R. *et al.* Combined effect of zidovudine (ZDV), lamivudine (3TC) and abacavir (ABC) antiretroviral therapy in suppressing in vitro FIV replication. **Antiviral Research**, v. 53, n. 1, p. 35-45, 2002.

BURLING, A. N. *et al.* Seroprevalences of feline leukemia virus and feline immunodeficiency virus infection in cats in the United States and Canada and risk factors for seropositivity. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 251, n. 2, p. 187-194, 2017.

CATTORI, V. *et al.* Real-time PCR investigation of feline leukemia virus proviral and viral RNA loads in leukocyte subsets. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 123, n. 1-2, p. 124-128, 2008.

CRAWFORD, P. C.; SLATER, M. R.; LEVY, J. K. Accuracy of polymerase chain reaction assays for diagnosis of feline immunodeficiency virus infection in cats. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 226, n. 9, p. 1503-1507, 2005.

ENGLERT, T. *et al.* Survey of the feline leukemia virus infection status of cats in Southern Germany. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 14, n. 6, p. 392-398, 2012.

GOMES-KELLER, M. A. *et al.* Shedding of feline leukemia virus RNA in saliva is a consistent feature in viremic cats. **Veterinary Microbiology**, v. 112, n. 1, p. 11-21, 2006.

GULICK, R. M. *et al.* Treatment with indinavir, zidovudine, and lamivudine in adults with human immunodeficiency virus infection and prior antiretroviral therapy. **New England Journal of Medicine**, v. 337, n. 11, p. 734-739, 1997.

HARTMANN, K. Regressive and progressive feline leukemia virus infections—clinical relevance and implications for prevention and treatment. **Thai Journal of Veterinary Medicine Supplement**, v. 47, p. 109-112, 2017.

HARTMANN, K. Infecção pelo Vírus da Leucemia Felina. In: GREENE, C. E. **Doenças Infecciosas em Cães e Gatos**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, c.11, p. 254-312, 2015

HARTMANN, K. Clinical aspects of feline retroviruses: a review. **Viruses**, v. 4, n. 11, p. 2684-2710, 2012.

HARTMANN, K. Clinical aspects of feline immunodeficiency and feline leukemia virus infection. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 143, n. 3, p. 190-201, 2011.

HARTMANN, K. Feline immunodeficiency virus infection: an overview. **Veterinary journal (London, England: 1997)**, v. 155, n. 2, p. 123-137, 1998.

HARTMANN, K; SELLON, R. K. Infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Felina. In: GREENE, C. E. **Doenças Infecciosas em Cães e Gatos**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, c.12, p. 313-339, 2015.

HARTMANN, K.; HOFMANN-LEHMANN, R. What's New in Feline Leukemia Virus Infection. **The Veterinary clinics of North America. Small animal practice**, v. 50, n. 5, p. 1013-1036, 2020.

HARTMANN, K. *et al.* Use of two virustatica (AZT, PMEA) in the treatment of FIV and of FeLV seropositive cats with clinical symptoms. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 35, n. 1-2, p. 167-175, 1992.

HELPER-HUNGERNUEHLER, A. K. *et al.* Long-term follow up of feline leukemia virus infection and characterization of viral RNA loads using molecular methods in tissues of cats with different infection outcomes. **Virus research**, v. 197, p. 137-150, 2015.

HO, D. D. Time to hit HIV, early and hard. **The New England journal of medicine**, v. 333, n. 7, p. 450-451, 1995.

HOFMANN-LEHMANN, R. *et al.* Feline leukaemia provirus load during the course of experimental infection and in naturally infected cats. **Journal of General Virology**, v. 82, n. 7, p. 1589-1596, 2001.

HOHDATSU, T. *et al.* Detection of feline immunodeficiency proviral DNA in peripheral blood lymphocytes by the polymerase chain reaction. **Veterinary microbiology**, v. 30, n. 2-3, p. 113-123, 1992.

LEVY, J. K. *et al.* Seroprevalence of feline leukemia virus and feline immunodeficiency virus infection among cats in North America and risk factors for seropositivity. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 228, n. 3, p. 371-376, 2006.

LITTLE, S.; KENNEDY, M. Doenças Infeciosas. In: Little, S. **O Gato: Medicina Interna**. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, c. 33, p. 990-1028, 2015.

LITTLE, S. *et al.* 2020 AAEP Feline Retrovirus Testing and Management Guidelines. **Journal of feline medicine and surgery**, v. 22, n. 1, p. 5-30, 2020.

LITTLE, S. *et al.* Seroprevalence of feline leukemia virus and feline immunodeficiency virus infection among cats in Canada. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 50, n. 6, p. 644, 2009.

MEDEIROS, S. O. *et al.* Avaliação de dois testes sorológicos comerciais para diagnóstico das infecções pelo FIV e pelo FeLV. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 71, n. 2, p. 447-454, 2019.

MENDES-DE-ALMEIDA, Flavya *et al.* Infection with *Dirofilaria immitis* and other infections in cats and dogs from Rio de Janeiro, Brazil: the need for prophylactic enforcement. **Acta Parasitologica**, v. 66, p. 962-968, 2021.

MENDES-DE-ALMEIDA, Flavya *et al.* Follow-up of the health conditions of an urban colony of free-roaming cats (*Felis catus* Linnaeus, 1758) in the city of Rio de Janeiro, Brazil. **Veterinary parasitology**, v. 147, n. 1-2, p. 9-15, 2007.

MILLER, C. *et al.* Applications of the FIV Model to Study HIV Pathogenesis. **Viruses**, v. 10, n. 4, p. 1-26, 2018.

MORTOLA, E. *et al.* Feline immunodeficiency virus infection: a comparative study of different diagnostic techniques. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.56, n.1, p.13-18, 2004

NAIDU, A. *et al.* Novel primers for complete mitochondrial cytochrome b gene sequencing in mammals. **Molecular ecology resources**, v. 12, n. 2, p. 191-196, 2012.

NESINA, S. *et al.* Retroviral DNA-the silent winner: blood transfusion containing latent feline leukemia provirus causes infection and disease in naïve recipient cats. **Retrovirology**, v. 12, n. 1, p. 1-18, 2015.

O'NEIL, L. L.; BURKHARD, M. J.; HOOVER, E. A. Frequent perinatal transmission of feline immunodeficiency virus by chronically infected cats. **Journal of Virology**, v. 70, n. 5, p. 2894-2901, 1996.

PEDERSEN, N. C. *et al.* Isolation of a T-lymphotropic virus from domestic cats with an immunodeficiency-like syndrome. **Science (New York, N.Y.)**, v. 253, p. 790-793, 1987.

PINCHES, M. D. G. *et al.* Diagnosis of feline leukaemia virus infection by semi-quantitative real-time polymerase chain reaction. **Journal of feline medicine and surgery**, v. 9, n. 1, p. 8-13, 2007.

QUIMBY, J. *et al.* 2021 AAHA/AAFP feline life stage guidelines. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 23, n. 3, p. 211-233, 2021.

RODAN, I. *et al.* 2022 AAFP/ISFM cat friendly veterinary interaction guidelines: approach and handling techniques. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 24, n. 11, p. 1093-1132, 2022.

SANTOS, C. R. G. R. *et al.* Undetectable proviral DNA and viral RNA levels after raltegravir administration in two cats with natural feline leukemia virus infection. **Brazilian Journal of Veterinary Medicine**, v. 44, p. 1-7, 2022.

SEPKOWITZ, K. A. AIDS - the first 20 years. **New England Journal of Medicine**, v. 344, n. 23, p. 1764-1772, 2001.

STONE, A. E. S. *et al.* 2020 AAHA/AAFP feline vaccination guidelines. **Journal of feline medicine and surgery**, v. 22, n. 9, p. 813-830, 2020.

STÜTZER, B. *et al.* Role of latent feline leukemia virus infection in nonregenerative cytopenias of cats. **Journal of veterinary internal medicine**, v. 24, n. 1, p. 192-197, 2010.

TANDON, R. *et al.* Quantitation of feline leukaemia virus viral and proviral loads by TaqMan® real-time polymerase chain reaction. **Journal of virological methods**, v. 130, n. 1-2, p. 124-132, 2005.

TAVARES, L. *et al.* Testing of nucleoside analogues in cats infected with feline leukemia virus: a model. **Intervirology**, v. 30, n. 1, p. 26-35, 1989.

TAYLOR, S. *et al.* 2022 ISFM/AAFP cat friendly veterinary environment guidelines. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 24, n. 11, p. 1133-1163, 2022.

TORRES, A. N.; MATHIASON, C. K.; HOOVER, E. A. Re-examination of feline leukemia virus: host relationships using real-time PCR. **Virology**, v. 332, n. 1, p. 272-283, 2005.

TORRES, A. N. *et al.* Development and application of a quantitative real-time PCR assay to detect feline leukemia virus RNA. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 123, n. 1-2, p. 81-89, 2008.



VAN R., Koen K. A. Evaluation of antiretrovirals in animal models of HIV infection. **Antiviral research**, v. 85, n. 1, p. 159-175, 2010.

WESTMAN, M. E.; MALIK, R.; NORRIS, J. M. Diagnosing feline immunodeficiency virus (FIV) and feline leukaemia virus (FeLV) infection: an update for clinicians. **Australian veterinary journal**, v. 97, n. 3, p. 47-55, 2019.

WESTMAN, M. E. *et al.* Seroprevalence of feline immunodeficiency virus and feline leukaemia virus in Australia: risk factors for infection and geographical influences (2011–2013). **Journal of Feline Medicine and Surgery Open Reports**, v. 2, n. 1, p. 1-11, 2016

YAMAMOTO, J. K. *et al.* Feline immunodeficiency virus pathogenesis and development of a dual-subtype feline-immunodeficiency-virus vaccine. **AIDS (London, England)**, v. 21, n. 5, p. 547-563, 2007.

## **8. ANEXOS**

### **8.1 Anexo I**



Comissão de Ética no  
Uso de Animais  
Instituto de Veterinária



## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Estudo do curso da infecção pelo FeLV através da técnica quantitativa qPCR em sangue periférico de uma população de gatos potencialmente exposta ao vírus.", protocolada sob o CEUA nº 9632171120 (p. anexo), sob a responsabilidade de **Helolisa Justen Moreira de Souza** e equipe: Carla Regina Gomes Rodrigues Santos - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (CEUA/UFRRJ) na reunião de 31/03/2021.

We certify that the proposal "Study of the course of infection by FeLV using the quantitative qPCR technique in peripheral blood of a cat population potentially exposed to the virus.", utilizing 115 Cats (males and females), protocol number CEUA 9632171120 (p. anexo), under the responsibility of **Helolisa Justen Moreira de Souza** and team: Carla Regina Gomes Rodrigues Santos - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Veterinary Institute of Rural Federal University of Rio de Janeiro (CEUA/UFRRJ) in the meeting of 03/31/2021.

Finalidade da Proposta: Pesquisa (Acadêmica)

Vigência da Proposta: de 04/2021 a 04/2022

Área: Clínica Médica

Origem: Animais de proprietários

Espécie: Gatos

sexo: Machos e Fêmeas

Idade: 3 a 300 meses

N: 115

Linhagem: Não se aplica

Peso: 1500 a 10000 g

Local do experimento: A triagem dos animais será realizada de acordo com critérios de inclusão e exclusão na Clínica Veterinária Rio Vet Center localizada no Município de São João de Meriti no Estado do Rio de Janeiro (Anexo II). Após a triagem, a coleta das amostras de sangue para o estudo serão realizadas em domicílio (residência ou abrigo de gatos) dos tutores. Autorização da Clínica Veterinária em anexo.

Seropédica, 02 de maio de 2021

Prof. Dr. Fabio Barbour Scott

Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

Carlos Alexandre Roy Matias

Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

## 8.2 Anexo II



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

**Quantificação de DNA pró-viral do vírus da Leucemia felina e avaliação clínica de gatos domésticos mantidos em abrigo.**

Razão Social/CEUA: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – CEUA IV

CIAEP: 02.0081.2019

Equipe Executora

<b>Nome</b>	<b>Telefone</b>	<b>E-mail</b>	<b>Função</b>
Heloisa Justen M. Sousa	21 99643-9025	heloisajusten@gmail.com	Pesquisadora Docente - Responsável
Carla Regina G. R. Santos	21964692559	carlavetuff@yahoo.com.br	Pesquisadora Discente -

Telefone CEUA/IV/UFRRJ: (21) 2682-3051

Responsável pelo animal: \_\_\_\_\_

Prezado Sr. (Sra.), O senhor está convidado (a) a autorizar a participação de seu animal em projeto de pesquisa, que tem como finalidade realizar o diagnóstico da infecção pelo FeLV e FIV em gatos expostos potencialmente ao vírus através do uso de técnicas moleculares, bem como compreender os fatores que determinam o curso da infecção em gatos expostos potencialmente ao vírus. Para isso será necessária uma única coleta de sangue através da venopunção no membro anterior ou posterior e a realização de um exame físico do seu animal. Essas coletas serão realizadas em residência após a triagem. Não haverá risco de vida ao animal. O desconforto/estresse que o animal será submetido é mínimo e está relacionado a contenção para o exame físico e coleta de sangue. Para minimizar esse desconforto o procedimento será realizado sempre pela Médica Veterinária responsável pelo estudo com experiência em atendimento a gatos domésticos e emprego de técnicas Cat Friendly Practices® (uma técnica reconhecida mundialmente para auxiliar na redução do estresse no gato pela manipulação veterinária). O diagnóstico positivo ou negativo para a infecção pelo FeLV é um importante fator de prognóstico para o animal. Esse resultado irá permitir que o tutor adote medida preventiva contra a doença (vacinação e segregação dos animais positivos), além de favorecer economicamente, visto que a realização destes são de custo relativamente alto.

Todos os procedimentos seguem os princípios éticos no uso de animais elaborados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Veterinária da UFRRJ sob o CEUA N° 9632171120. Sua autorização para a inclusão do(s) seu(s) animal(is) nesse estudo é voluntária. Seu(s) animal(is) poderá(ão) ser retirado(s) do estudo, a qualquer momento, sem que isso cause qualquer prejuízo a ele(s). A confidencialidade dos seus dados pessoais será preservada. Os membros da CEUA ou as autoridades regulatórias poderão solicitar suas informações, e nesse caso, elas serão dirigidas especificamente para fins de inspeções regulares.

O Médico Veterinário responsável pelo(s) seu(s) animal(is) será a Carla Regina Gomes Rodrigues Santos, inscrita no CRMV sob o nº 8987. Além dele, a equipe do Pesquisador principal Heloisa Justen Moreira de Sousa também se responsabilizará pelo bem estar do(s) seu(s) animal(is) durante todo o estudo dele.

Quando for necessário, durante ou após o período do estudo, você poderá entrar em contato com o pesquisador Principal ou com sua equipe pelos contatos descritos no início do documento.

### **Declaração de consentimento**

*Fui devidamente esclarecido(a) sobre todos os procedimentos deste estudo, seus riscos e benefícios ao(s) animal(is) pelo(s) qual(is) sou responsável. Fui também informado que posso retirar meu(s) animal(is) do estudo a qualquer momento. Ao assinar esse Termo de Consentimento, declaro que autorizo a participação do(s) meu(s) animal (is) identificado(s), a seguir, neste projeto.*

### Identificação dos animais

<b>Nome ou número</b>	<b>Espécie</b>	<b>Raça</b>	<b>Idade</b>
-----------------------	----------------	-------------	--------------

Este documento será assinado em duas vias, sendo que uma via ficará comigo e a outra com o pesquisador.

\_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Responsável

\_\_\_\_\_  
Assinatura do pesquisador

### **8.3 Anexo III**



















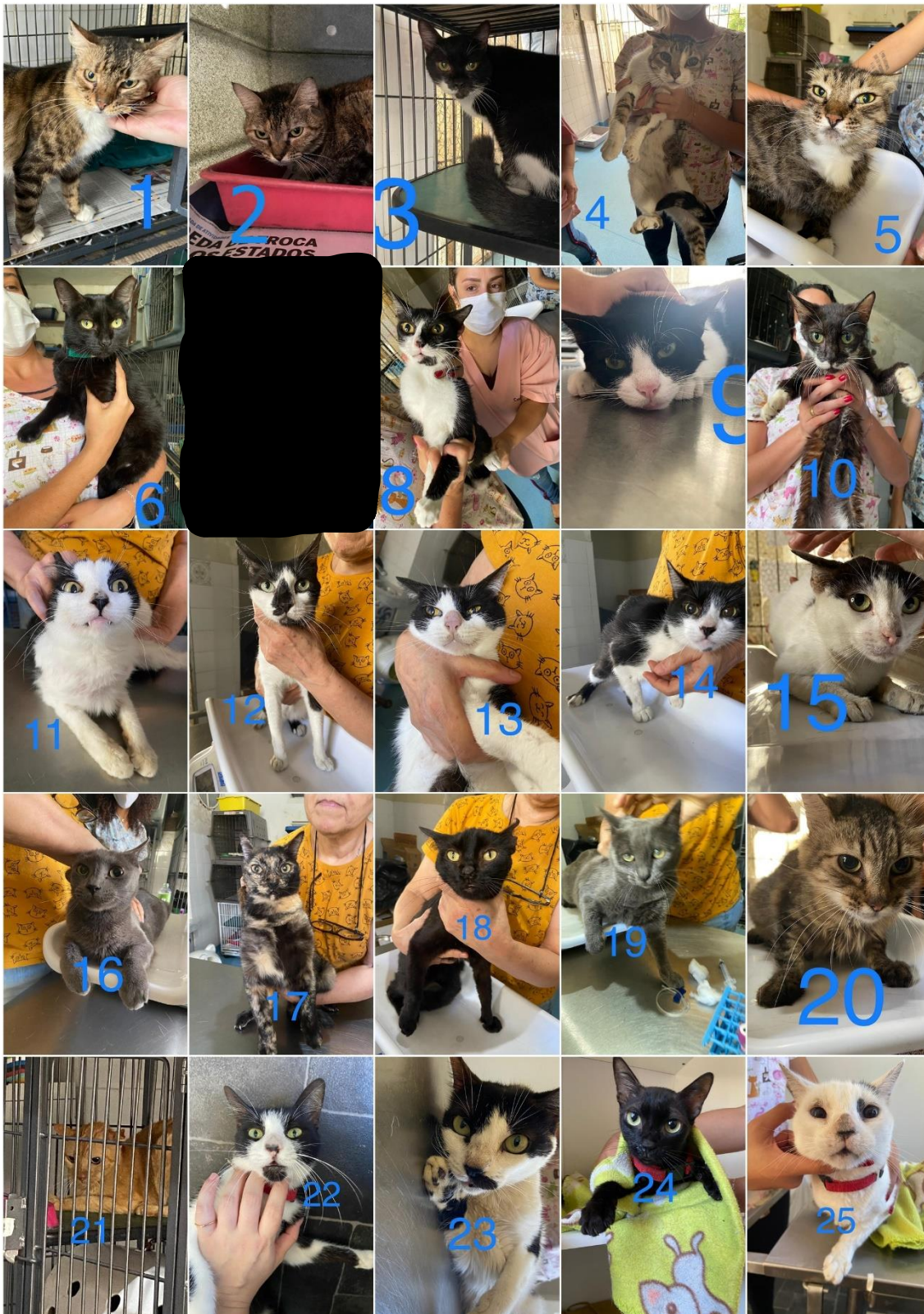




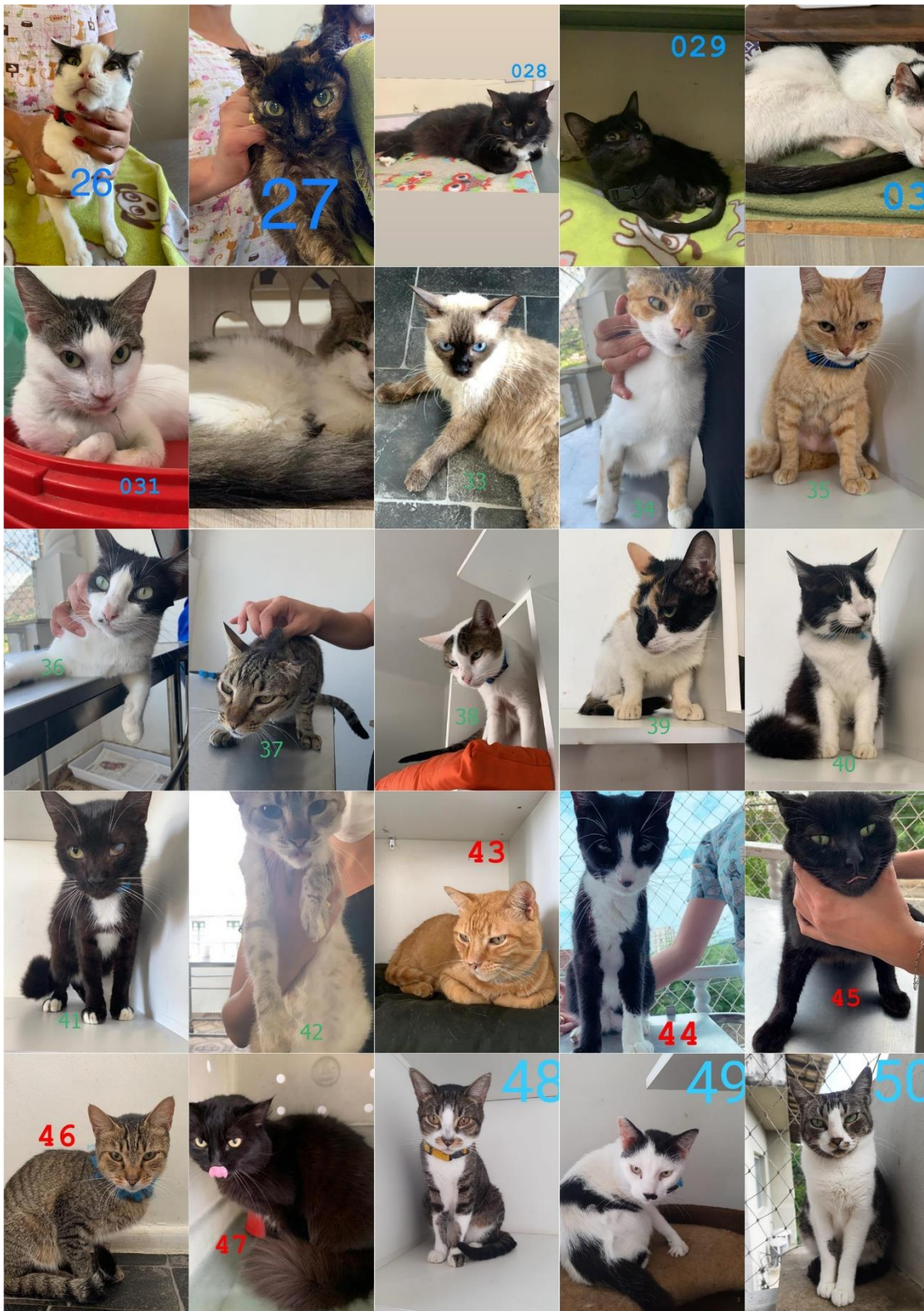




8.4 Anexo IV



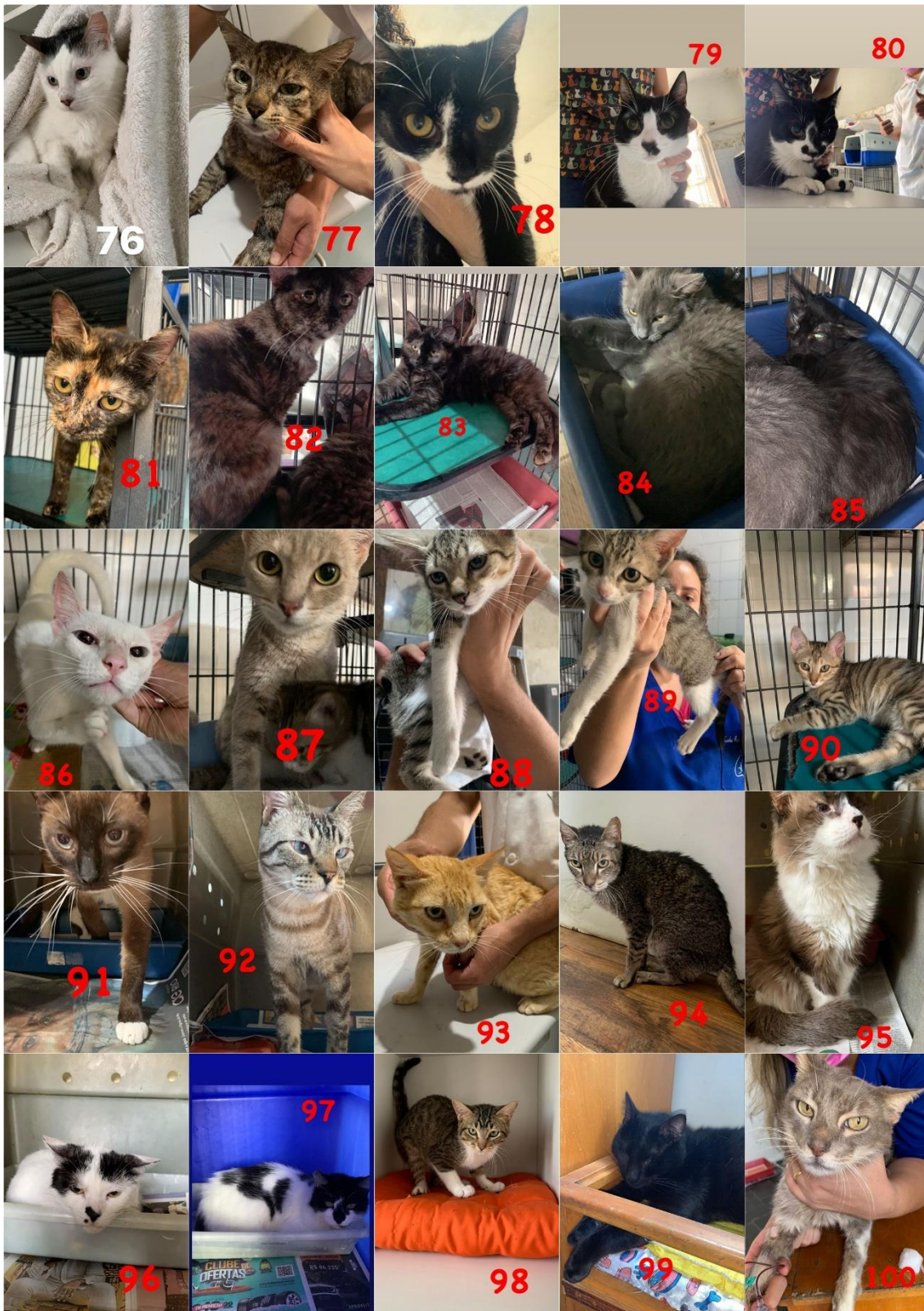
















## 8.5 Anexo V



### AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS CLÍNICOS DO ESTUDO:

Quantificação de DNA pró-viral do vírus da Leucemia felina e avaliação clínica de gatos domésticos mantidos em abrigo.

**Identificação gato: n°**

**Raça:**

**Sexo:**

**Estado reprodutivo:**

**Faixa etária:**

**Escore corporal:**

**Classificação da Condição Corporal**

SUB-ÓTIMA		ÓTIMA	SOBRE-ÓTIMA	

**Sinais Clínicos/Manifestações clínicas**

---

---

---

---

---