

Ocorrência do subtipo B do vírus da imunodeficiência felina em gatos domésticos da região sul do estado do Rio Grande do Sul, Brasil

[Occurrence of subtype B of the feline immunodeficiency virus in domestic cats from the south region of Rio Grande do Sul state, Brazil]

F.S. Silva¹, C.C. Castro¹, P.F. Finger¹, D.S. Silva¹, S.A. Taniwaki², L.S. Ullmann², G. Fischer¹, G.D. Vargas¹, M. Lima¹, J.P. Araújo Jr², S.O. Hübner¹

¹Faculdade de Veterinária – Universidade Federal de Pelotas – Capão do Leão, RS

²Instituto de Biociências – Universidade Estadual Paulista – Botucatu, SP

RESUMO

No Brasil existem poucos estudos sobre a ocorrência da infecção pelo vírus da imunodeficiência felina (FIV), assim como a determinação dos subtipos circulantes, o que é indispensável para o desenvolvimento de vacinas e novos testes diagnósticos. O presente trabalho investigou a ocorrência da infecção pelo FIV entre os anos de 2010 e 2011 em gatos domésticos submetidos a atendimento clínico na cidade de Pelotas e região. Amostras de sangue total de 70 animais, incluindo suspeitos (28) ou não suspeitos (42) da infecção pelo FIV, foram submetidas à reação de PCR nested. Os resultados indicaram uma frequência de infecção de 15,7% (11/70) e a análise dos fatores associados (sexo, idade e condição clínica) evidenciou uma maior ocorrência em gatos com idade superior a 10 anos e acometidos por infecções crônicas e recidivantes. Oito amostras positivas na PCR nested foram submetidas a sequenciamento genômico e somente o subtipo B foi detectado na região estudada.

Palavras-chave: gato, vírus da imunodeficiência felina, PCR

ABSTRACT

In Brazil there are few studies on the occurrence of the feline immunodeficiency virus (FIV) infection and its subtypes, which are essential for the development of vaccines and new diagnostic tests. The present study investigated the occurrence of the FIV infection between 2010 and 2011 in domestic cats submitted to medical attendance in the city of Pelotas and nearby area. Total blood samples of seventy cats, suspected (28) or not (42) of infection by FIV were analyzed by nested PCR in order to perform a diagnosis. The results pointed to a FIV infection frequency of 15.7% (11/70) and the analysis of the risk factors related to infection (sex, age and clinical condition) evidenced a greater occurrence in cats up to 10 years of age with chronic and recurrent infections. Eight samples found positive by nested PCR were submitted to DNA sequencing indicating that only the subtype B was detected in the studied region.

Keywords: cat, feline immunodeficiency virus, PCR

INTRODUÇÃO

O vírus da imunodeficiência felina (FIV) é um retrovírus do gênero *Lentivirus*, que apresenta estrutura molecular e patogenia similar ao HIV (Hosie *et al.*, 2009). Os gatos infectados pelo FIV podem desenvolver disfunção imunológica caracterizada por hipergamaglobulinemia,

elevação de linfócitos B CD21⁺ e depleção de linfócitos T CD4⁺ (Takano *et al.*, 2012). Os sinais clínicos observados são variáveis e inespecíficos. Em geral, os gatos podem manifestar gengivite, emaciação, linfadenomegalia, insuficiência renal crônica, complicações neurológicas, diarreia crônica e infecções bacterianas (Zanutto *et al.*, 2011), além de alterações hematológicas, como anemia,

Recebido em 21 de fevereiro de 2013

Aceito em 30 de setembro de 2013

E-mail: silvamedvet@hotmail.com

leucopenia e linfopenia (Arjona *et al.*, 2000). Entretanto, em relação ao HIV, o vírus da imunodeficiência felina apresenta menor potencial de virulência, sendo que a maioria dos gatos infectados permanece assintomática por longos períodos, mesmo na ausência de tratamento antirretroviral (Hartmann, 2011; White e Norris, 2011).

O FIV é classificado em cinco subtipos bem caracterizados e filogeneticamente diferentes. Os subtipos A, B e C estão mundialmente distribuídos, o subtipo D é encontrado no Japão e Vietnã, e o subtipo E somente foi identificado na Argentina (Pecoraro *et al.*, 1996; Teixeira *et al.*, 2010b). Recentemente, foram descritos dois novos subtipos: o subtipo F, detectado nos Estados Unidos e Portugal, e o subtipo U-NZenv, encontrado na Nova Zelândia (Hayward e Rodrigo, 2010; Teixeira *et al.*, 2010b). Além disso, recombinações entre os subtipos têm sido descritas (Bachmann *et al.*, 1997). No Brasil, pouco se conhece sobre a diversidade genética do FIV. Até o momento, a caracterização molecular de isolados do FIV foi realizada somente nos estados de Minas Gerais, São Paulo e Rio de Janeiro, onde apenas o subtipo B foi identificado (Caxito *et al.*, 2006; Lara *et al.*, 2007; Martins *et al.*, 2008; Teixeira *et al.*, 2010a).

O FIV é considerado um agente cosmopolita e apresenta prevalência variável de acordo com a área geográfica, com o comportamento e o estado de saúde dos gatos estudados. Nos Estados Unidos e Canadá, valores de prevalência de 1 a 7% foram encontrados, ao passo que no Japão a taxa de prevalência reportada foi de 44% (Hayward e Rodrigo, 2010). Um estudo realizado no estado de São Paulo, incluindo 454 felinos oriundos de 13 cidades, demonstrou que 14,7% (67/454) dos gatos estavam infectados (Lara *et al.*, 2008). No Rio Grande do Sul, uma investigação epidemiológica referente à infecção pelo FIV, realizada na cidade de Porto Alegre, constatou uma taxa de infecção de 21,5% (14/65) (Silva, 2007).

Objetivou-se com o presente trabalho determinar a frequência de infecção pelo FIV na cidade de Pelotas, região sul do Rio Grande do Sul, mediante a detecção de DNA proviral pela técnica de PCR nested, além de realizar a caracterização molecular das amostras

circulantes na região e analisar fatores associados à infecção.

MATERIAL E MÉTODOS

Durante o período de agosto de 2010 a agosto de 2011, foram colhidas 70 amostras de sangue de gatos submetidos a atendimento médico no Hospital de Clínicas Veterinária da Universidade Federal de Pelotas (UFPel) e Clínicas Veterinárias privadas, localizadas na cidade de Pelotas e região adjacente. Os animais testados foram classificados em dois grupos quanto à condição clínica: o grupo 1 foi representado por 28 gatos que apresentavam linfadenomegalia, sinais neurológicos e/ou infecções crônicas ou recidivantes, sendo considerados suspeitos de imunodeficiência; no grupo 2 foram alocados 42 animais livres de sintomatologias descritas como relacionadas à infecção pelo FIV. Após o diagnóstico, todos os pacientes positivos receberam acompanhamento médico de no mínimo seis meses, com o objetivo de avaliar a evolução clínica e estabelecer a taxa de letalidade.

As amostras sanguíneas foram obtidas por punção venosa, acondicionadas em frascos contendo anticoagulante EDTA e armazenadas a 4°C. A extração do DNA proviral foi obtida utilizando-se o *kit* QIAamp (QIAGEN®), conforme especificações do fabricante, em até 30 dias após a colheita das amostras. Posteriormente, as amostras foram submetidas à reação de PCR nested, utilizando-se primers correspondentes à região p17 e p24 do gene *gag*, descritos por Hohdatsu *et al.* (1998). A primeira reação amplifica uma sequência de nucleotídeos de 658 pares de base (pb) e a segunda reação, uma sequência de 329 pb (Hohdatsu *et al.*, 1998). Cada reação foi realizada num volume total de 25µl contendo: 1,25U de Taq DNA Polimerase (InvitrogenTM), 2,5µl de tampão de PCR 10X, 1,75mM de MgCl₂, 0,25mM de cada dNTP, 10 pmol de cada *primer*, 1,5M de Betaine (Sigma-Aldrich®) e 5µl do DNA extraído. Os ciclos padronizados para a amplificação do DNA foram: uma incubação inicial a 96°C por 7 minutos, seguida de 45 ciclos, cada um consistindo em desnaturação a 94°C por 60 segundos, anelamento a 45°C por 60 segundos, extensão pela polimerase a 72°C por 90 segundos e extensão final a 72°C por 5 minutos. Ao final da reação, os produtos foram

submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corado com brometo de etídio (0,5 mg/ml), e comparados com marcadores de massa molecular de 100 pb (Ludwig Biotec). Incluíram-se em todas as reações amostras contendo água ultrapura como controle negativo e uma amostra de DNA, extraída de sangue total de um gato naturalmente infectado (gentilmente cedida pelo Laboratório de Virologia e Diagnóstico Molecular do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências da UNESP/Botucatu-SP), como controle positivo.

Com o intuito de identificar o subtipo de FIV presente nas amostras estudadas, realizou-se a amplificação da região V3-V4 do gene *env*, através de PCR nested com primers previamente descritos (Martins *et al.*, 2008). A reação foi realizada num volume final de 25µl, contendo 12,5µl do GoTaq® Green Master Mix 2x (Promega®), 10 pmol de cada primer e 5µl do DNA extraído (reação de PCR) ou 1µl do produto de PCR (reação de nested). A amplificação foi realizada com uma etapa inicial de desnaturação a 94°C por cinco minutos, seguida de 35 ciclos de 94°C por um minuto, para desnaturação da fita de DNA, 51°C por um minuto, para a hibridização dos primers, e 72°C por um minuto e 30 segundos para a extensão das fitas, e uma fase de extensão final de 72°C por cinco minutos. Os produtos da PCR nested foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com SYBR® Safe DNA gel Stain (Invitrogen™) em comparação com o marcador de massa molecular GeneRuler™ 100bp DNA Ladder (Fermentas®). Os produtos de amplificação das amostras que apresentaram fragmento esperado de 554pb foram purificados com o *kit* Illustra GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare®), e quantificados em gel de agarose 1,5% corado com SYBR® Safe DNA gel Stain (Invitrogen™) em comparação com o Low DNA Mass Ladder (Invitrogen™). Em seguida, foram submetidos ao sequenciamento bidirecional direto utilizando o BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) e o aparelho de sequenciamento automático ABI 3500 (Applied Biosystems), conforme orientação do fabricante. Apenas fragmentos com alta qualidade (Quality value >20) foram utilizados para a determinação da porcentagem de identidade de nucleotídeos no programa Bioedit Sequence Alignment Editor version 7.0.5.3 (Hall, 1999).

Variáveis, como condição clínica, faixa etária e sexo, foram analisadas como possíveis fatores de associação à infecção pelo FIV, mediante o tratamento estatístico do Qui-quadrado (χ^2), fixando-se o valor de 1% para o nível de rejeição da hipótese de nulidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 70 amostras submetidas à PCR nested, 11 apresentaram resultado positivo, indicando uma frequência de infecção pelo FIV de 15,7% na população estudada. O valor encontrado é similar aos resultados descritos nos estados do Rio de Janeiro (16,7%) e São Paulo (14,7%) (Souza *et al.*, 2002; Lara *et al.*, 2008). Estudos de prevalência, realizados nos Estados Unidos e Canadá, detectaram 1% de infecção em gatos hígidos e 7% em animais doentes, dados esses muito inferiores aos do presente estudo. Contrastando com os valores da América do Norte, a prevalência encontrada no Japão, onde a população de gatos errantes é muito alta, foi de 44% (Hayward e Rodrigo, 2010), valor bem superior ao dos levantamentos epidemiológicos realizados no Brasil até o presente momento.

Em relação ao estado de hígidez dos pacientes (Tab. 1), foi observado que a proporção de felinos positivos com sinais clínicos associados à FIV (10/28) foi estatisticamente superior ($p < 0,01$) à proporção de felinos assintomáticos (1/42), estando de acordo com resultados encontrados em diversos levantamentos epidemiológicos (Caldas *et al.*, 2000; Souza *et al.*, 2002; Lara *et al.*, 2008; Murray *et al.*, 2008). Dos felinos positivos para FIV, 90,9% (10/11) já apresentavam sinais clínicos relacionados à infecção no momento do diagnóstico, caracterizados principalmente por infecções broncopulmonares (4/10) e cutâneas (3/10) secundárias. Outras alterações clínicas associadas à infecção por FIV, como gengivite, uveíte, anemia e icterícia, também foram detectadas nos animais positivos.

O conhecimento da variabilidade genética do FIV é fundamental no desenvolvimento de vacinas que induzem imunidade protetora a subtipos específicos de uma determinada área. Além disso, também possibilita a associação de subtipos do FIV com determinados padrões clínicos específicos (Teixeira *et al.*, 2010b). No Brasil, até o momento, foi descrita apenas a

ocorrência do subtipo B (Caxito *et al.*, 2006; Lara *et al.*, 2007; Martins *et al.*, 2008; Teixeira *et al.*, 2010a). O presente estudo foi realizado em região relativamente próxima à Argentina, onde foi identificado o subtipo E (Pecoraro *et al.*, 1996). Contudo, das 11 amostras com resultado positivo na PCR nested específica para o gene *gag*, oito foram submetidas ao sequenciamento e identificadas como subtipo B, uma vez que demonstraram identidade de nucleotídeos de 92,8 a 98,1% numa sequência de 323pb em comparação com sequência identificada em Minas Gerais (número de acesso *GenBank* DQ641682; Caxito *et al.*, 2006). Os resultados deste estudo indicam que o subtipo B é predominante na região analisada, sugerindo que possivelmente ainda não tenha sido introduzida outra variante do vírus na região.

Dos felinos com sinais clínicos de FIV, 30% (3/10) vieram a óbito durante o período de seis meses de observação após o diagnóstico. Possivelmente, a baixa taxa de letalidade verificada no estudo está relacionada ao subtipo B, que apresenta como característica a baixa virulência (Bachmann *et al.*, 1997), ao contrário do subtipo C, que está associado à enfermidade aguda e de acentuada imunodeficiência, chegando a 60% de mortalidade 18 semanas pós infecção (De Rozieres e Thompson, 2008).

A categoria sênior (Tab. 1) apresentou de maneira significativa ($p < 0,01$) a maior proporção de felinos diagnosticados com FIV (6/9). Esse resultado era esperado devido ao fato de a infecção pelo FIV apresentar fase assintomática de período prolongado, determinando o aparecimento tardio dos sinais clínicos, mesmo que a infecção tenha ocorrido em idade jovem (Hartmann, 2011; White e Norris, 2011). Contudo, diferentemente de outros estudos que apontam os machos inteiros como os mais suscetíveis à infecção pelo FIV (Lara *et al.*, 2008; Murray *et al.*, 2008; Samman *et al.*, 2011), não foi observada diferença estatística entre sexos. Sabe-se que gatos machos não castrados e com acesso à rua geralmente exibem um repertório comportamental distinto, com uma tendência a entrar constantemente em conflitos por acasalamento, facilitando a transmissão do

FIV por meio de mordeduras, sendo que gatos domiciliados que apresentam contato com outros da mesma espécie estabelecem conflitos principalmente por local de repouso, uso da caixa de dejetos e obtenção de alimento (Crowell-Davis *et al.*, 2004). Considerando que a maioria dos animais do estudo eram domiciliados, o contágio de gatos machos a partir de conflitos por acasalamento foi provavelmente infrequente. E, alternativamente, o fato de gatos machos inteiros não apresentarem maior proporção de infecção pode também estar atribuído a um número insuficiente de amostras analisadas.

Tabela 1. Análise de fatores associados à infecção pelo FIV nos 70 gatos oriundos de Pelotas segundo sua positividade à PCR nested

Fatores	Total de Amostras	Amostras Positivas (%)
Condição clínica		
Suspeito de infecção pelo FIV	28	10 (35,7%)*
Não suspeito	42	1 (2,4%)
Condição sexual		
Macho	25	3 (12%)
Macho castrado	12	1 (8,3%)
Fêmea	21	4 (19,1%)
Fêmea castrada	12	3 (25%)
Faixa etária		
<1 ano (jovem)	21	0 (0%)
1-4 anos (adulto jovem)	18	3 (16,6%)
5-10 anos (adulto)	15	2 (13,3%)
>10 anos (sênior)	9	6 (66,6%)*
Idade desconhecida	7	0 (0%)

*Estatisticamente significativo no nível de 1%.

CONCLUSÃO

Os resultados apontam uma frequência de infecção pelo FIV de 15,7% e permitem afirmar que o subtipo B do FIV circula na população de felinos domésticos da região sul do Rio Grande do Sul. Os dados mostram ainda que gatos com idade superior a 10 anos e acometidos por infecções crônicas ou recidivantes apresentam a maior proporção de animais positivos para o FIV.

REFERÊNCIAS

- ARJONA, A.; ESCOLAR, E.; SOTO, I. *et al.* Seroepidemiological survey of infection by feline leukemia virus and immunodeficiency virus in Madrid and correlation with some clinical aspects. *J. Clin. Microbiol.*, v.38, p.3448-3449, 2000.
- BACHMANN, M.H.; MATHIASON-DUBARD, C.; LEARN, G.H. *et al.* Genetic diversity of feline immunodeficiency vírus: Dual infection, recombination, and distinct evolutionary rates among envelope sequence clades. *J. Virol.*, v.71, p.4241-4252, 1997.
- CALDAS, A.P.F.; LEAL, E.S.; SILVA, E.F.A.; RAVAZZOLO, A.P. Detecção do provírus da imunodeficiência felina em gatos domésticos pela técnica de reação em cadeia da polimerase. *Pesq. Vet. Bras.*, v.20, p.20-25, 2000.
- CAXITO, F.A.; COELHO, M.E.; RESENDE, M. Phylogenetic an analysis of feline immunodeficiency vírus strains from State of Minas Gerais, Brazil. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.58, p.1222-1225, 2006.
- CROWELL-DAVIS, S.L.; CURTIS, T.M.; KNOWLES, R.J. Social organization in the cat: a modern understanding. *J. Feline Med. Surg.*, v.4, p.19-28, 2004.
- DE ROZÌERES, S.; THOMPSON, J. Replication properties of clade A/C chimeric feline immunodeficiency viruses and evaluation of infection kinetics in the domestic cat. *J. Virol.*, v.82, p.7953-7963, 2008.
- HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp.*, v.41, p.95-98, 1999.
- HARTMANN, K. Clinical aspects of feline immunodeficiency and feline leukemia virus infection. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.143, p.190-201, 2011.
- HAYWARD, J.; RODRIGO, A.G. Molecular epidemiology of feline immunodeficiency virus in the domestic cat. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.134, p.68-74, 2010.
- HOHDATSU, T.; MOTOKAWA, K.; USAMI, M. *et al.* Genetic subtyping and epidemiological study of feline immunodeficiency virus by nested polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analyses of the gag gene. *J. Virol. Methods*, v.70, p.107-111, 1998.
- HOSIE, M.J.; ADDIE, D.; BELÁK, S. *et al.* Feline immunodeficiency : ABCD guidelines on prevention and management. *J. Feline Med. Surg.*, v.11, p.575-584, 2009.
- LARA, M.V.; TANIWAKI, S.A.; ARAÚJO Jr. Ocurrence of feline immunodeficiency virus infection in cats. *Cienc. Rural*, v.38, p.2245-2249, 2008.
- LARA, M.V.; TANIWAKI, S.A.; ARAÚJO Jr., J.P. Caracterização filogenética de amostras do vírus da imunodeficiência felina (FIV) do Estado de São Paulo. *Pesq. Vet. Bras.*, v.27, p.467-470, 2007.
- MARTINS, A.N.; MEDEIROS, S.O.; SIMONETTI, J.P. *et al.* Phylogenetic and genetic analyses of feline immunodeficiency virus gag, pol and env genes from domestic cats undergoing nucleoside reverse transcriptase inhibitor treatment or treatment-naïve in Rio de Janeiro, Brazil. *J. Virol.*, v.82, p.7863-7874, 2008.
- MURRAY, J.K.; ROBERTS, M.A.; SKILLINGS, E. *et al.* Risk factors for feline immunodeficiency virus antibody test status in Cats Protection adoption centres (2004). *J. Feline Med. Surg.*, v.11, p.467-473, 2009.
- PECORARO, M.R.; TOMONAGA, K.; MIYAZAWA, T. *et al.* Genetic diversity of Argentine isolates of feline immunodeficiency virus. *J. Gen. Virol.*, v.77, p.2031-2035, 1996.
- SAMMAN, A.; MCMONAGLE, E.L.; LOGAN, N. *et al.* Phylogenetic characterization of naturally occurring feline immunodeficiency virus in the United Kingdom. *Vet. Microbiol.*, v.150, p.239-247, 2011.
- SILVA, F.R.C. *Prevalência das infecções pelo vírus da leucemia viral felina e da imunodeficiência viral felina na cidade de Porto Alegre.* 2007. 57f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

SOUZA, H.J.M.; TEIXEIRA, C.H.R.; GRAÇA, R.F.S. Estudo epidemiológico de infecções pelo vírus da leucemia e/ou imunodeficiência felina, em gatos domésticos do município do Rio de Janeiro. *Clin. Vet.*, v.36, p.14-21, 2002.

TAKANO, T.; HOSOYA, S.; SHIBAO, A. *et al.* Comparative study of the plasma globulin level, CD21⁻ B-cell counts and FOXP3 mRNA expression level in CD4⁺ T-cells for different clinical stages of feline immunodeficiency virus infected cats. *Res. Vet. Sci.*, v.92, p.157-161, 2012.

TEIXEIRA, B.M.; LOGAN, N.; CRUZ, J.C.M. *et al.* Genetic diversity of brazilian isolates of feline immunodeficiency virus. *Arch. Virol.*, v.155, p.379-384, 2010a.

TEIXEIRA, B.M.; RAJÃO, D.S.; HADDAD, J.P.A. *et al.* Ocorrência do vírus da imunodeficiência felina e do vírus da leucemia felina em gatos domésticos mantidos em abrigos no município de Belo Horizonte. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.59, p.939-942, 2007.

TEIXEIRA, B.M.; RECHE Jr., A.; HAGIWARA, M.K. Vírus da imunodeficiência felina – uma atualização. *Clin. Vet.*, v.88, p.54-66, 2010b.

WHITE, J.; NORRIS, J.M. Feline immunodeficiency virus: disease association versus causation in domestic and nondomestic felids. *Vet. Clin. Small Anim.*, v.41, p.1197-1208, 2011.

ZANUTTO, M.S.; FROES, T.R.; TEIXEIRA, A.L.; HAGIWARA, M.K. Características clínicas da fase aguda da infecção experimental de felinos pelo vírus da imunodeficiência felina. *Pesq. Vet. Bras.*, v.31, p.255-260, 2011.