

Comunicação

[Communication]

Ocorrência do vírus da leucemia felina em *Felis catus* em Belo Horizonte

[Occurrence of feline leukemia virus in *Felis catus* in Belo Horizonte]

F.M. Coelho¹, M.Q. Maia¹, M.M. Luppi¹, E.A. Costa^{1,2}, A.P.M.F. Luiz¹, N.A. Ribeiro¹,
M.R.Q. Bomfim³, F.G. Fonseca¹, M. Resende¹

¹Laboratório de Virologia Comparada - Instituto de Ciências Biológicas - UFMG - Belo Horizonte, MG

²Laboratório de Patologia Molecular - Escola de Veterinária - UFMG - Belo Horizonte, MG

³Laboratório de Agentes Recombinantes - Instituto de Ciências Biológicas - UFMG - Belo Horizonte, MG

O vírus da leucemia felina (FeLV), pertencente à família *Retroviridae* e ao gênero *Gammaretrovirus*, pode infectar gatos domésticos e esporadicamente felinos selvagens. Este retrovírus felino está associado a uma série de doenças degenerativas ou proliferativas, tais como leucemias e linfomas. A leucemia e o linfoma são manifestações incomuns da infecção provocada pelo FeLV nos animais persistentemente infectados, sendo mais frequente o desenvolvimento de anemias, doenças neurológicas e imunodeficiências. O FeLV foi classificado em quatro subgrupos distintos, FeLV-A, FeLV-B, FeLV-C e FeLV-T, de acordo com diferenças nas sequências de nucleotídeos da região N-terminal da glicoproteína de superfície (SU). Tais variações nesta proteína provocam alterações estruturais responsáveis pela utilização de diferentes receptores nas células hospedeiras (Levy *et al.*, 2008; Torres *et al.*, 2010).

Sequências endógenas relacionadas ao FeLV (enFeLV) são fragmentos de DNA viral presentes no genoma de gatos domésticos e de outros felinos selvagens. Apesar de essas sequências serem expressas e traduzidas, elas não são capazes de gerar partículas virais infecciosas. Entretanto, o enFeLV pode recombinar-se com o vírus exógeno FeLV subgrupo A, durante a transcrição reversa do RNA, gerando vírus infecciosos do subgrupo B com atividades biológicas e patogenicidade alteradas. O FeLV-C é gerado por mutação do gene *env* do FeLV-A que modifica uma pequena

região variável na glicoproteína SU do envelope viral. Alterações específicas e uma pequena inserção de aminoácidos, bem como alterações na sequência motivo PHQ localizada na extremidade N-terminal da SU do FeLV-A, resultaram no aparecimento de uma variante viral denominada FeLV-T (Tandon *et al.*, 2008).

A infecção por esse retrovírus pode ser diagnosticada pela detecção do antígeno viral p27 nos leucócitos, plasma, soro, lágrimas ou saliva dos animais infectados. Os testes mais utilizados são os ensaios de imunofluorescência por anticorpo (IFA) e o ensaio imunoenzimático direto (ELISA) (Torres *et al.*, 2010). Entretanto, testes moleculares como a reação em cadeia da polimerase (PCR), estão cada vez mais sendo utilizados devido às vantagens sobre os testes sorológicos, pois, além de detectarem e identificarem os agentes virais, permitem também caracterizá-los geneticamente (Tandon *et al.*, 2008).

Estudos epidemiológicos demonstram que o FeLV está disseminado em vários países e que sua ocorrência varia de acordo com a região geográfica. No Brasil, estudos sorológicos realizados em São Paulo e no Rio de Janeiro mostraram que a prevalência varia de 12,5 a 20,3%, respectivamente (Hagiwara *et al.*, 1997; Souza *et al.*, 2002). Em Minas Gerais, um estudo sorológico realizado em abrigos de gatos em Belo Horizonte detectou prevalência de 22,5% em fêmeas e de 10%, em machos (Teixeira *et al.*, 2007).

Recebido em 21 de março de 2011

Aceito em 4 de abril de 2011

*Autor para correspondência (*corresponding author*)

E-mail: fabismc@gmail.com.br

O objetivo principal deste levantamento foi analisar a ocorrência do provírus do FeLV na população felina de acordo com a região administrativa de Belo Horizonte, MG.

Foram analisadas 1072 amostras de sangue total obtidas de gatos domésticos, selecionados aleatoriamente, atendidos em diversas clínicas veterinárias e em Hospital Veterinário Escola, no período de março de 2002 a janeiro de 2008. As amostras de sangue, acondicionadas em tubos contendo EDTA, foram utilizadas para obtenção de leucócitos (PBL) segundo métodos descritos por Toth *et al.* (1992). A extração do DNA total foi feita com isotiocianato de guanidina e sílica, de acordo com Boom *et al.* (1999). Para detectar o provírus do FeLV exógeno, o DNA total das amostras de PBL foi empregado como molde para amplificação pela PCR-nested. Os oligonucleotídeos iniciadores externos e internos utilizados baseiam-se na sequência de nucleotídeos de parte do gene *gag* e da região *U3* da LTR do genoma do FeLV (A, B, C e T) e, portanto, não detectam as sequências endógenas semelhantes ao FeLV (enFeLV) presentes no genoma dos gatos domésticos (Miyazawa e Jarrett, 1997).

O DNA proviral do FeLV foi detectado em 507 animais (47,5% – intervalo de confiança a 95%) (Fig. 1A). Estudos sorológicos realizados em Belo Horizonte, MG, São Paulo e Rio de Janeiro encontraram baixas taxas de infecção pelo FeLV, de 32,5%, 12,5% e 20,3%, respectivamente, quando comparadas aos resultados obtidos neste estudo (Hagiwara *et al.*, 1997; Souza *et al.*, 2002; Teixeira *et al.*, 2007). A discrepância entre os resultados reflete a sensibilidade da metodologia utilizada. Os testes sorológicos ELISA e IFA detectam anticorpos contra as proteínas virais p27 e p55, respectivamente, e apresentam alto número de resultados falso-negativos. Além disso, testes moleculares, como a PCR, permitem a detecção do FeLV na fase inicial da infecção e em casos de infecções latentes (Tandon *et al.*, 2008).

Com o intuito de verificar a qualidade do DNA extraído, bem como evitar resultados falso-negativos, o DNA obtido de gatos considerados FeLV-negativos (n=565) foi submetido a novos ensaios de PCR. Para tal, utilizaram-se oligonucleotídeos iniciadores baseados na sequência de parte do gene *GADPH* do genoma

dos gatos (Shi e Roy-Burman, 2000). Foi observado, em todas essas amostras, um produto único de DNA compatível com o tamanho molecular (aproximadamente 598pb) esperado para a região codificadora do gene *GADPH* (Fig. 1B), confirmando a viabilidade do DNA usado nos ensaios de PCR.

Uma ficha clínica de identificação foi elaborada para determinar os parâmetros característicos da infecção pelo FeLV nos gatos. Além disso, os animais foram distribuídos em nove grupos, de acordo com a região administrativa da cidade: Venda Nova (64), Norte (72), Nordeste (89), Pampulha (126), Noroeste (61), Leste (239), Centro-Sul (279), Oeste (110) e Barreiro (32). A associação entre a ocorrência do provírus com características como sexo, idade, raça, estado de higiene – saudável ou doente –, sinais clínicos e procedência do animal – gatil, rua, abrigo ou doméstico com/e sem acesso à rua – foi avaliada na tentativa de identificar os gatos mais prováveis de albergarem o provírus. A transmissibilidade relativa do vírus foi avaliada em locais com mais de um gato.

Para comparações entre variáveis qualitativas, foram utilizados os testes do qui-quadrado ou de tendência e o teste exato de Fisher. Para as variáveis não qualitativas, usou-se o teste Mann-Whitney (Triola, 1998). O valor $P < 0,005$ foi considerado significativo mediante a aplicação do Monte Carlo no *software* SSPSS 15.00.

Na Fig. 2A, mostra-se a distribuição dos gatos domésticos positivos e negativos pela PCR-nested de acordo com a região administrativa de Belo Horizonte. Observou-se correlação ($P < 0,05$) entre a região e o fato de o gato doméstico possuir ou não o provírus. A ocorrência de gatos com o provírus por região foi: Norte, 68,1%; Leste, 54,4%; Centro-Sul, 50,5%; Nordeste, 44,9%; Noroeste, 42,6%; Pampulha, 41,3%; Oeste, 37,3%; e Barreiro, 31,3%.

A ocorrência do FeLV foi comum em gatos de diferentes idades. A idade média encontrada neste estudo foi de $4,17 \pm 3,16$ anos. O provírus estava presente em 38,6% dos gatos com menos de um ano; 56,1% entre um e três anos; 52,7% entre quatro e nove anos e em 15,9% dos animais com idade acima de 10 anos (Fig. 2B).

Verificou-se forte evidência ($P < 0,05$) de que gatos entre um e três anos são mais prováveis de serem portadores do provírus do que de outros grupos etários. Diferentes faixas etárias de gatos positivos para FeLV já foram relatadas (Souza *et al.*, 2002).

A ocorrência do FeLV entre os gatos sem raça definida (SRD) e entre animais de raça foi de 63,4% e 62,5%, respectivamente, não sendo observada predisposição racial para infecção pelo FeLV. Resultados semelhantes foram obtidos em um estudo epidemiológico realizado no Rio de Janeiro por Souza *et al.* (2002).

A diferença na proporção entre machos e fêmeas negativos e positivos para o FeLV também não foi significativa ($P > 0,05$), com 48,5% e 46,1%,

respectivamente. Contudo, um estudo epidemiológico realizado nos Estados Unidos apontou os machos como os mais afetados pelo FeLV (Braley, 1994).

De acordo com o teste do qui-quadrado, a procedência e o modo de vida dos gatos influenciaram significativamente ($P < 0,05$) na ocorrência pelo FeLV. A ocorrência do FeLV entre os gatos domiciliados com acesso e sem acesso à rua foi 64,3% e 61,4%, respectivamente. Entre os provenientes de abrigos, gatis e gatos de rua, foram 39,4%, 47,6% e 53,0%, respectivamente (Fig. 2C). Estes resultados confirmam outros estudos epidemiológicos que consideram o acesso à rua um dos fatores mais importantes na infecção por este retrovírus (Braley, 1994).

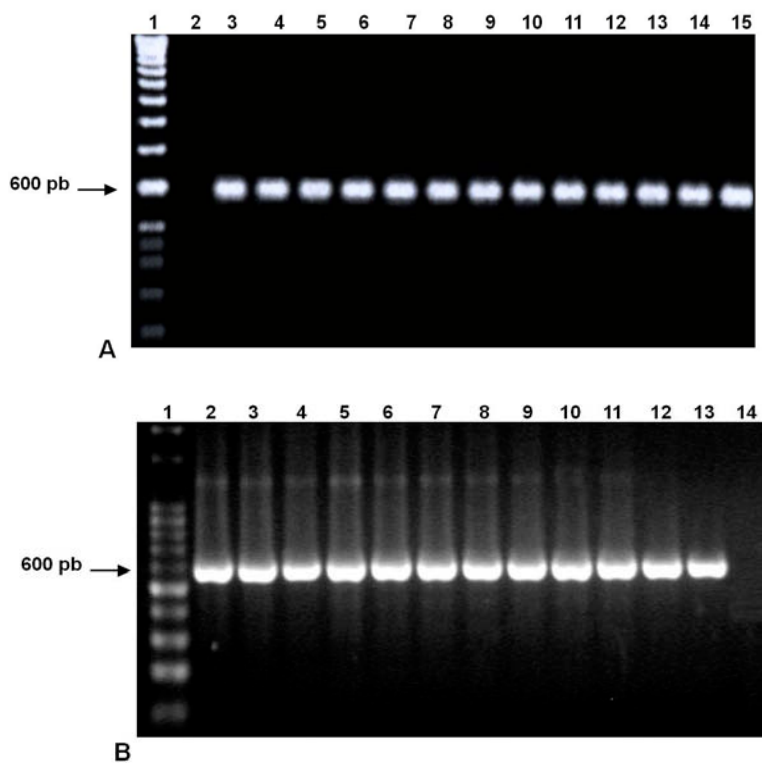


Figura 1. Amplificação, por PCR-nested, de parte do gene *gag* e região U3 da LTR do genoma do FeLV e por PCR de parte do gene *GADPH* do genoma dos gatos domésticos. A) Gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio, mostrando os produtos amplificados pela PCR-nested utilizando os dois pares de iniciadores externos e internos baseados em parte do gene *gag* e região U3 da LTR do genoma do FeLV. *Canaleta 1*: padrão de tamanho molecular Ladder 1KB (Invitrogen-BRL); *Canaleta 2*: controle dos reagentes (sem DNA); *canaleta 3*: controle positivo amplificado do clone p61E (FeLV-A); *canaletas 3 a 15*: fragmentos de DNA de aproximadamente 601pb amplificados das amostras 328, 575, 901MG, 1087, 1230, 1231, 1234, 1236, 1244, 1245, 1247 e 1248 obtidas de gatos domésticos. B) Gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio, mostrando os produtos amplificados pela PCR de parte do gene *GADPH* do genoma dos gatos domésticos. *Canaleta 1*: padrão de tamanho molecular Ladder 100pb (Invitrogen-BRL); *canaletas 2 a 13*: fragmento de DNA de aproximadamente 598pb das amostras 744, 752, 860, 885, 1030, 1269, 1132, 1133, 1140, 1144, 1147, e 1148. *Canaleta 14*: controle dos reagentes (sem DNA).

Ocorrência do vírus...

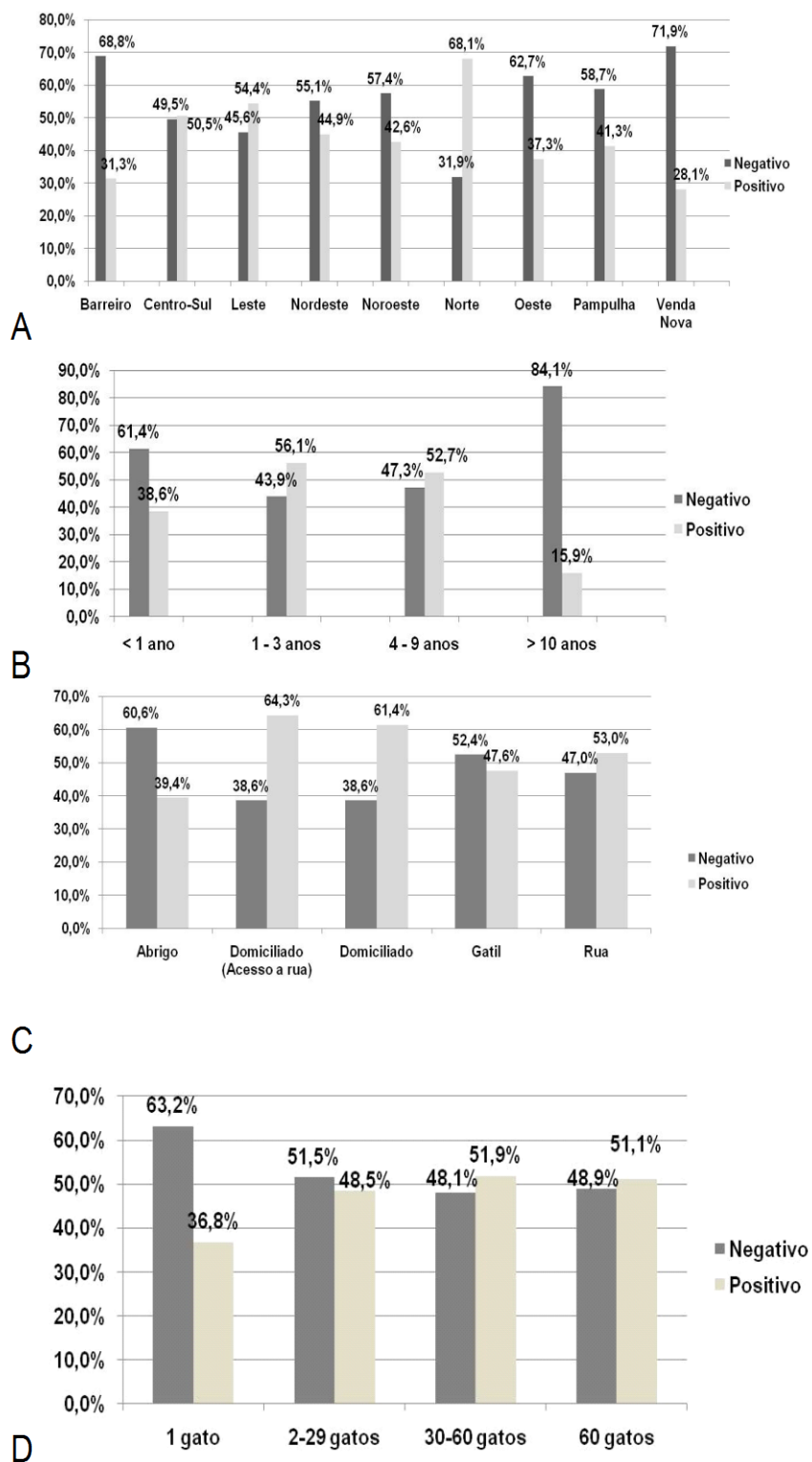


Figura 2. Representação gráfica da distribuição dos gatos domésticos positivos e negativos para o DNA proviral do FeLV, pela PCR-nested. **A)** Regiões Administrativas de Belo Horizonte. **B)** a faixa etária **C)** a procedência (rua, gatil, abrigo, domiciliado e domiciliado com acesso a rua) **D)** a quantidade de gatos vivendo em um mesmo ambiente.

O número de gatos que vivem no mesmo ambiente influenciou ($P < 0,05$) na detecção do provírus. Onde havia apenas um gato, a ocorrência foi de 36,8%, de dois a 29 gatos, 48,5%, de 30 a 60 gatos, 51,9%, e quando esses números foram maiores que 60 animais, a ocorrência foi de 51,1% (Fig. 2D). De acordo com Levy *et al.* (2008), a infecção pelo FeLV é favorecida por locais com elevada densidade populacional, nos quais até 30% dos animais tornam-se persistentemente infectados em um curto período de tempo.

A ocorrência da infecção pelo FeLV foi semelhante entre os animais doentes (47,2%) e saudáveis (47,4%), confirmando estudos epidemiológicos realizados no Rio de Janeiro, onde não foi observada diferença na ocorrência entre os gatos doentes e saudáveis (Souza *et al.*,

2002). As principais manifestações clínicas apresentadas pelos gatos doentes foram: linfadenopatia (38,9%), anorexia (35,8%), gengivite (29,6%), conjuntivite (25,9%), emagrecimento (31,5%), diarreia (23,5%) e esplenomegalia (19,1%).

Os resultados mostram a importância do uso de métodos moleculares como a PCR para diagnóstico do FeLV, principalmente em casos de infecções latentes que normalmente não são detectadas pelos testes sorológicos. Além disso, realçam a necessidade da implementação de medidas apropriadas de controle da transmissão do FeLV, uma vez que grande número de animais apresentaram-se positivos.

Palavras-chave: gato, leucemia felina, retrovírus, PCR-nested

ABSTRACT

Blood samples from 1,072 domestic cats of nine administrative regions of Belo Horizonte, MG, were collected and tested using PCR nested for the occurrence of feline leukemia virus (FeLV). Overall occurrence was 47.5% (507/1072) being North (68.1%) and East (54.4%) the most prevalent areas. Epidemiological data showed that FeLV infection was very common among examined cats and breed neither gender nor were predisposing factors for FeLV. The results suggest that the agglomeration of a large number of cats in the same environment can be an important factor for the increase in the rate of transmission of this retrovirus among domestic cats in the studied city.

Keywords: cat, feline, leukemia, retrovirus, PCR-nested

AGRADECIMENTOS

À FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais, CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e CAPES (Coordenação de Pessoal de Nível Superior) suporte financeiro. Às clínicas veterinárias e ao Hospital Veterinário Escola – UFMG pelo fornecimento das amostras clínicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BOOM, R.; SOL, C.; BELD, M. *et al.* Improved silica-guanidiniumthiocyanate DNA isolation procedure based on selective binding of bovine alpha-casein to silica particles. *J. Clin. Microbiol.*, v.37, p.615-619, 1999.

BRALEY, J. FeLV and FIV: survey shows prevalence in the United States and Europe. *Feline Pract.*, v.22, p.25-28, 1994.

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

LEVY, J.; CRAWFORD, C.; HARTMANN, K. *et al.* American association of feline practitioners' feline retrovirus management guidelines. *J. Feline Med. Surg.*, v.10, p.300-316, 2008.

MIYAZAWA, T.; JARRETT, O. Feline leukaemia virus proviral DNA detected by polymerase chain reaction in antigenaemic but non-viraemic ('discordant') cats. *Arch. Virol.*, v.142, p.323-332, 1997.

SHI, Y.; ROY-BURMAN, P. A novel truncated env gene isolated from a feline leukemia virus-induced thymic lymphosarcoma. *J. Virol.*, v.74, p.1451-1456, 2000.

Ocorrência do vírus...

SOUZA, J.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.

TANDON, R.; CATTORI, V.; PEPIN, A.C. *et al.* Association between endogenous feline leukemia virus loads and exogenous feline leukemia virus infection in domestic cats. *Virus Res.*, v.135, p.136-143, 2008.

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.

TORRES, A.N.; O'HALLORAN, K.P.; LARSON *et al.* Feline leukemia virus immunity induced by whole inactivated virus vaccination. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.134, p.122-131, 2010.

TOTH, T.E.; SMITH, B.; PYLE, H. Simultaneous separation and purification of mononuclear and polymorphonuclear cells from the peripheral blood of cats. *J. Virol. Methods*, v.36, p.185-196, 1992.

TRIOLA, M.F. *Introdução à estatística*. 7.ed. Rio de Janeiro: LTC Editora, 1998.