

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

Ocorrência dos vírus da imunodeficiência felina (FIV) e leucemia felina (FeLV) em felinos no município de Porto Alegre, RS

Fernando Finoketti

Porto Alegre
2011

Fernando Finoketti

Ocorrência dos vírus da imunodeficiência felina (FIV) e leucemia felina (FeLV) em felinos no município de Porto Alegre, RS

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Área de concentração: Virologia

Orientador: Profa. Ana Cláudia Franco

Porto Alegre

2011

Agradecimentos

À Profa. Ana Cláudia Franco pela orientação e ensinamentos que me foram proporcionados, os quais me acompanharão durante a minha vida profissional e científica.

Ao amigo Fabrício pela amizade e ajuda em todos os passos da realização desse projeto.

Aos professores Fernando Rosado Spilki e Luciana Almeida Lacerda, por aceitarem o convite para participar da banca.

Aos colegas do Laboratório de Virologia, pelos momentos que passamos juntos, seja nos momentos de trabalho ou de descontração.

Aos integrantes do Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias do Hospital Veterinário da UFRGS, pela coleta das amostras.

À minha família, especialmente pai Jadir, minha mãe Ilineta e meu irmão Felipe que mesmo distante sempre me fornecem o apoio que necessito e não mediram esforços para que esse sonho se realizasse.

Aos amigos que sempre estão presentes quando necessito.

À FAPERGS e à CNPq pelo apoio financeiro.

E a todos que contribuíram para a realização e conclusão deste trabalho.

Índice Geral

1. Resumo.....	5
2. Introdução.....	6
3. Artigo.....	10
Resumo.....	12
Abstract.....	13
Introdução.....	14
Materiais e Métodos.....	16
Resultados.....	19
Discussão.....	20
Conclusão.....	23
Ilustrações.....	24
Agradecimentos.....	28
Referências.....	29
4. Discussão e Perspectiva.....	32
5. Referências não presentes no artigo.....	34
6. Anexo.....	36

1. Resumo

Os vírus da imunodeficiência felina (FIV) e da leucemia felina (FeLV) pertencem a família *Retroviridae* e apresentam grande disseminação mundial, principalmente em gatos criados com livre acesso à ambientes externos. Os sinais clínicos da infecção pelos dois agentes são semelhantes, e estão associados a um quadro de imunossupressão nos animais infectados. Assim, o diagnóstico clínico muitas vezes é inconclusivo, tornando necessária a utilização de testes laboratoriais para o diagnóstico definitivo. Entre as provas utilizadas para a confirmação do diagnóstico está a reação em cadeia da polimerase (PCR). Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi padronizar uma reação em cadeia da polimerase (PCR) para diagnosticar animais infectados por esses dois agentes e, com isso, realizar um estudo epidemiológico das duas infecções na população de gatos atendidos no Hospital Veterinário da Faculdade de Veterinária da UFRGS no período de Março a Junho de 2011. Para isso foram coletadas amostras de sangue total de gatos em tubos contendo EDTA e a extração de DNA foi realizada através do método padrão de extração com fenol / precipitação com etanol. O DNA extraído das amostras foi conservado a 4°C. A região amplificada pela PCR corresponde ao gene *gag*, com produtos de 589 pb para FIV e 450 para FeLV. Das 77 amostras submetidas à PCR, 26 (34%) amostras foram positivas para FIV e 23 (30%) para FeLV, sendo 13 (17%) casos de co-infecção. Os resultados obtidos com esse trabalho permitem concluir a presença dos agentes nos animais pesquisados e apontam para a necessidade de testes diagnósticos específicos para a prevenção e controle destas enfermidades.

2. Introdução

O vírus da imunodeficiência felina (FIV) e o vírus da leucemia felina (FeLV) pertencem à família *Retroviridae* e são amplamente disseminados em todos os continentes (Lutz, 1990). Ambos apresentam um efeito imunossupressor nos animais acometidos, tornando os sinais clínicos das duas infecções semelhantes. Dessa forma, o diagnóstico clínico, muitas vezes, é inconclusivo, e fazem-se necessários exames laboratoriais complementares para sua confirmação. Os testes mais utilizados são os testes sorológicos, que tem por finalidade detectar anticorpos específicos ou antígenos virais no soro ou plasma dos animais, como o ensaio de imunoadsorção enzimática, ELISA (Miyazawa, 2002). Além destes, são utilizados, também, testes moleculares, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), eficiente para detectar o DNA proviral em amostras clínicas (Caldas ET AL., 2000; Miyazawa, 2002).

O FIV é da subfamília *Lentivirinae* e foi descrito por Pedersen e colaboradores em 1987, em um gatil onde os animais apresentavam sinais de imunodeficiência, porém, eram soronegativos para FeLV (Pedersen et al., 1987). Os animais mais suscetíveis são os machos não castrados com livre acesso às ruas (Little et al., 2009). O seu comportamento agressivo na defesa de territórios, principalmente em casos de mordidas, facilitam o contato com o vírus, o qual é excretado pela saliva de animais doentes (Yamamoto et al., 1988, 1989; Brown et al., 1993; Little et al., 2009). Os primeiros estudos com FIV não confirmaram a transmissão vertical. Contudo O'Neil et al (1996) indicaram a existência de casos de transmissão uterina, durante o parto e por meio da amamentação, das mães portadoras de infecção crônica a seus descendentes. Não foi comprovada a existência de anticorpos específicos contra FIV em humanos com contato estreito com gatos, demonstrando que o vírus não infecta humanos. Porém, pessoas com alterações imunológicas devem evitar o contato com gatos FIV positivos, pois existe a possibilidade de que estes, sob imunossupressão, excretem agentes de doenças oportunistas como a toxoplasmose e a criptosporidiose para humanos (Greene, 1995).

Até o momento já foram identificados cinco subtipos de FIV (A, B, C, D e E), os quais resultam de duas variações genéticas. A primeira é baseada em alterações na região V3-V5 do gene *env* (Sodora et. al., 1994; Kakinuma et. al., 1995; Pecoraro et. al., 1996), e a segunda, na sequência de nucleotídeos da p17-p24 do gene *gag* (Kakinuma et. al., 1995; Hohdatsu et. al., 1998; Steinrigl & Klein, 2003; Duarte &

Tavares, 2005). Porém, no Brasil, foram encontradas apenas amostras do subtipo B (Caixito et. al., 2006; Lara et. al., 2007).

O curso da enfermidade causada por FIV foi dividido por Ishida e Tomoda (1990) em 5 fases distintas. Na primeira, a fase aguda, os animais podem apresentar linfadenopatia, neutropenia transitória, diarreia aguda, sintomas leves de alteração no trato respiratório superior e febre transitória. Essa fase se inicia semanas após a infecção e pode durar de 4 a 16 semanas. Na fase seguinte, os animais passam a se tornar portadores assintomáticos, podendo ser portadores do vírus sem apresentarem sintomas por um longo período de tempo. Já no terceiro estágio, o animal apresenta sinais leves da enfermidade, como por exemplo, febre recorrente de origem desconhecida, leucopenia, linfadenopatia, anemia, anorexia, perda de peso e algumas alterações específicas no comportamento. Aproximadamente um terço dos gatos infectados com FIV levados a clínicas veterinárias estão nessa fase de linfadenopatia generalizada persistente. A quarta fase é denominada de fase do complexo associado à síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS). Os animais nesse estágio apresentam elevada perda de peso, diarreia crônica, alterações no trato respiratório superior, estomatite, gengivite crônica, infecções crônicas da pele e linfadenopatia. As infecções que acometem os animais nessa fase geralmente não são de caráter oportunista, e sim, são infecções secundárias de caráter bacteriano. Dentre elas a mais frequente é a inflamação da cavidade oral (Gentile et. al., 1996), sendo observada em até 50% dos animais infectados (Ishida et.al., 1989). A quinta e última fase da infecção por FIV é uma condição de síndrome de imunodeficiência adquirida (SIDA) semelhante à que ocorre nos humanos infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV). Nesse estágio, o animal desenvolve infecções oportunistas em múltiplos órgãos e tem uma sobrevida de aproximadamente 6 meses. Também podem ocorrer outros tipos de alterações imunológicas, neurológicas, oculares ou neoplásicas, associadas à SIDA ou como manifestações únicas da infecção por FIV (Yamamoto et. al., 1989).

Devido às semelhanças biológicas e patogênicas entre o FIV e o HIV, a infecção de felinos com FIV tem sido utilizada como modelo experimental no estudo do desenvolvimento da AIDS (Yamamoto et al., 1988; Olmsted et al., 1989; Tompkins et al., 1991). A sua utilização como modelo de HIV já foi utilizada em diferentes abordagens da patogenia (O'Neil et al., 1996), no desenvolvimento e

avaliação de vacinas (Siebelink et al., 1995; Richardson et al., 1998; Yamamoto et al., 2010) e desenvolvimento de drogas antivirais (Smith et al., 1998).

O FeLV é um vírus que pertence à família *Gammaretrovirus* e pode causar leucemias, linfossarcomas, síndromes mieloproliferativas e imunossupressão. Esse vírus é transmitido principalmente por contato direto entre os animais e pela ingestão de alimentos contaminados (Hoover & Mullins, 1991). Outras formas de transmissão incluem secreções respiratórias e lacrimais, leite, urina e fezes (Arjona et al., 2000), além de poder ocorrer a transmissão venérea e transplacentária (Harbour et al., 2002). A maior causa de mortalidade de gatos virêmicos está relacionada à imunossupressão (aproximadamente 80%) enquanto que os 20% restantes são devidos ao aparecimento de tumores, principalmente linfomas (Pontier et al., 1998; Costa et al., 2000). Assim como os animais infectados pelo FIV, os animais infectados pelo FeLV também podem se portar como reservatórios para zoonoses como a toxoplasmose e a criptosporidiose (Barr et al, 1997).

Até o momento foram isolados três subgrupos de FeLV (A, B e C), sendo que os subgrupos B e C são derivados de mutações e recombinações do subgrupo A e só foram encontrados em forma de co-infecção com o mesmo (Loar, 1993; Barr et al., 1997). Essa diferenciação é baseada em diferenças nas proteínas específicas do núcleo e antígenos virais. O FeLV-A ocorre em todos os gatos FeLV positivos e desencadeia nos animais uma imunossupressão grave. Já o FeLV-B acomete cerca de 50% dos felinos FeLV positivos e aumenta a frequência de doenças neoplásicas se comparados com gatos infectados somente com FeLV-A. Por sua vez, FeLV-C ocorre apenas em cerca de 1% dos gatos infectados pelo FeLV e origina um quadro de anemia grave (Iyer et al, 2005).

Assim como o FIV, o quadro de imunossupressão que acomete o animal infectado por FeLV o torna um recipiente para diversos agentes de zoonoses e de infecções oportunistas, como por exemplo, toxoplasmose e criptosporidiose. Dessa forma, o controle dessas infecções é de extrema importância para evitar que essas zoonoses se espalhem na população de felinos evitando, assim, o risco de contaminação de humanos.

Devido à impossibilidade de diferenciar estas duas infecções com base em exames clínicos, há necessidade da utilização de exames laboratoriais. Desta forma, o presente trabalho busca padronizar dois testes de diagnóstico através da PCR para

FIV e FeLV, e, a seguir, fazer um estudo epidemiológico das infecções por estes agentes no município de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

3. Artigo

Os resultados deste trabalho serão apresentados na forma de manuscrito a ser submetido ao *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, seguindo as instruções da revista (anexo).

1 Ocorrência do vírus da imunodeficiência felina (FIV) e do vírus da leucemia
2 felina (FeLV) em felinos no município de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

3

4 *Occurrence of feline immunodeficiency virus (FIV) and feline leukemia virus*
5 *(FeLV) in cats from Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.*

6

7 Fernando Finoketti¹; Fabrício Souza Campos¹; Martha Trindade Oliveira¹; Gustavo
8 Costa de Oliveira; Caroline Weissheimer Costa Gomes³; Francisco de Oliveira
9 Conrado³; Paulo Michel Roehé^{1,2}; Ana Cláudia Franco¹

10

11 ¹Laboratório de Virologia – Instituto de Ciências Básicas da Saúde – Universidade
12 Federal do Rio Grande do Sul

13 ²Instituto de Pesquisa Veterinária Desidério Finamor (IPVDF)

14 ³Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias do Hospital Veterinário da
15 Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

16

17

18 Endereço para correspondência:

19 Profa. Dra. Ana Cláudia Franco

20 Laboratório de Virologia – Departamento de Microbiologia, Parasitologia e
21 Imunologia

22 Instituto de Ciências Básicas da Saúde

23 Universidade Federal do Rio Grande do Sul

24 Rua Sarmiento Leite, 500, Sala 208

25 CEP 90050-170 - Porto Alegre - RS Brasil

26

27 Resumo

28 O vírus da imunodeficiência felina e o vírus da leucemia felina estão
29 amplamente difundidos no mundo. Ambos causam um quadro de imunossupressão
30 nos animais infectados, tornando-os potenciais reservatórios para diversos agentes de
31 zoonoses. Devido às semelhanças clínicas das duas infecções, o diagnóstico é
32 determinado pela associação de sintomas com exames laboratoriais. Assim, o
33 objetivo desse trabalho foi padronizar uma reação em cadeia da polimerase (PCR)
34 para diagnosticar animais infectados por esses dois agentes e, com isso, realizar um
35 estudo epidemiológico das duas infecções no município de Porto Alegre. Foram
36 analisadas 77 amostras de sangue coletadas de gatos atendidos no Hospital de
37 Clínicas Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Destas, 26
38 (33,76%) foram positivas para FIV, 23 (29,87%) foram positivas para FeLV e 13
39 (16,88%) foram positivas para ambos os vírus. Os resultados obtidos com esse
40 trabalho permitem a demonstração do DNA proviral dos agentes nos animais
41 pesquisados e apontam para a necessidade de testes diagnósticos específicos para a
42 prevenção e controle destas enfermidades.

43

44 Palavras-chave: felino, vírus da imunodeficiência felina, vírus da leucemia felina,
45 PCR

46 |

47 *Abstract*

48 *The feline immunodeficiency virus and feline leukemia virus are widely*
49 *spread worldwide. Both viruses cause immunosuppression in infected animals, which*
50 *can then be the source for infectious agents of zoonosis for humans. Given the*
51 *clinical similarities between both diseases, the diagnosis is determined by the*
52 *association of symptoms with laboratory tests. The objective of this work was to set*
53 *up and optimize a polymerase chain reaction (PCR) that could be applied to the*
54 *diagnosis of FIV and FeLV infections and, therefore, conducting an epidemiological*
55 *study of both infections in the city of Porto Alegre. We analyzed 77 blood samples of*
56 *domestic cats which attended to the Veterinary Hospital of the Veterinary Faculty of*
57 *the Federal University of Rio Grande do Sul. Twenty six samples (33.76%) were*
58 *positive for FIV, 23 (29.87%) were positive for FeLV and 13 (16.88%) were positive*
59 *for both viruses. The results obtained with this work allows us to conclude that DNA*
60 *of these agents is present in the animal population studied here and suggest the need*
61 *for diagnostic tests for the prevention and control of these diseases.*

62

63 *Keywords: feline, feline immunodeficiency virus, feline leukemia virus, PCR*

64

65 Introdução

66 O vírus da imunodeficiência felina (FIV) e o vírus da leucemia felina (FeLV)
67 pertencem a família *Retroviridae* e são amplamente disseminados em todos os
68 continentes (Lutz, 1990). Ambos apresentam um efeito imunossupressor nos animais
69 infectados, tornando os sinais clínicos das duas infecções semelhantes. Dessa forma,
70 o diagnóstico clínico, muitas vezes, é inconclusivo, e fazem-se necessários exames
71 laboratoriais complementares para sua confirmação. Os testes mais utilizados são os
72 testes sorológicos, que tem por finalidade detectar anticorpos específicos ou
73 antígenos virais no soro ou plasma dos animais, como o ensaio de imunoadsorção
74 enzimática, ELISA (Miyazawa, 2002). Além destes, são utilizados, também, testes
75 moleculares, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), eficiente para detectar o
76 DNA proviral em amostras clínicas (Caldas ET AL., 2000; Miyazawa, 2002).

77 O FIV é da subfamília *Lentivirinae* e foi descrito por Pedersen e colaboradores
78 em 1987, em um gatil onde os animais apresentavam sinais de imunodeficiência,
79 porém, eram soronegativos para FeLV (Pedersen et al., 1987). Os animais mais
80 suscetíveis são os machos que tem livre acesso às ruas (Lutz, 1990). Isto ocorre
81 devido ao seu comportamento agressivo na defesa de seu território, uma vez que a
82 principal via de transmissão desse vírus é através da saliva, especificamente em casos
83 de mordidas (Yamamoto et al., 1988, 1989; Brown et al., 1993).

84 Até o momento já foram identificados cinco subtipos de FIV (A, B, C, D e E),
85 os quais são resultado de duas mutações genéticas. A primeira é baseada em
86 alterações na região V3-V5 do gene *env* (Sodora et. al., 1994; Kakinuma et. al.,
87 1995; Pecoraro et. al., 1996), e a segunda na sequência de nucleotídeos da p17-p24
88 do gene *gag* (Kakinuma et. al., 1995; Hohdatsu et. al., 1998; Steinrigl & Klein, 2003;
89 Duarte & Tavares, 2005). Porém, no Brasil, foram encontradas apenas amostras do
90 subtipo B (Caixito et. al., 2006; Lara et. al., 2007).

91 O FeLV é um vírus que pertence a família *Gammaretrovirus* e pode causar
92 leucemias, linfossarcomas, síndromes mieloproliferativas e imunossupressão. Esse
93 vírus é transmitido principalmente por contato direto entre os animais e pela ingestão
94 de alimentos contaminados (Hoover & Mullins, 1991). A maior causa de mortalidade
95 de gatos virêmicos está relacionada à imunossupressão (aproximadamente 80%)
96 enquanto que os 20% restantes são devidos ao aparecimento de tumores,
97 principalmente linfomas (Pontier et al., 1998; Costa et al., 2000).

98 Até o momento foram isolados três subgrupos de FeLV (A, B e C), baseando-
99 se em diferenças nas proteínas específicas do núcleo e antígenos virais. (Iyer et al,
100 2005). Os subgrupos B e C são derivados de mutações e recombinações do subgrupo
101 A e só foram encontrados em forma de co-infecção com o mesmo (Loar, 1993; Barr
102 et. al., 1997).

103 Como a infecção pelos dois agentes causa um quadro de imunossupressão, os
104 animais doentes se tornam uma fonte de infecção de agentes de diversas zoonoses e
105 infecções oportunistas, como por exemplo, toxoplasmose e criptosporidiose. Como
106 essas são doenças de impacto em saúde pública, o controle de doenças
107 imunossupressoras como as causadas pelo FIV e FeLV se torna importante para
108 evitar que essas zoonoses se espalhem na população de felinos, diminuindo, assim, o
109 risco de contaminação de humanos.

110 Devido à impossibilidade de diferenciar estas duas infecções com base em
111 exames clínicos, há necessidade da utilização de exames laboratoriais. Desta forma,
112 o presente trabalho busca padronizar dois testes de diagnóstico através da PCR para
113 detecção de DNA proviral de FIV e FeLV em amostras de sangue de gatos
114 domésticos, e, a seguir, fazer um estudo epidemiológico das infecções por estes
115 | agentes no município de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

116 Materiais e Métodos

117

118 Coleta de amostras

119 Foram coletadas 89 amostras de sangue total, em frascos com anticoagulante,
120 de gatos machos e fêmeas domésticos atendidos no Hospital de Clínicas Veterinárias
121 da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Os procedimentos foram aprovados
122 pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Após
123 a coleta, o sangue será armazenado individualmente em tubos mantidos refrigerados,
124 durante o transporte, até ao laboratório; onde será retirada uma alíquota para o teste e
125 o restante será congelado a -70°C .

126

127 Extração de DNA

128 Quatrocentos microlitros de sangue foram incubados em 600 μL de solução de
129 lise (500 μL TEN [20 mM de Tris-HCL, pH 7,4; 10 mM de EDTA, pH8,0; 200 mM
130 de Na Cl] 2X + 100 μL SDS (10%) + 10 μL de Proteinase K) durante 1 hora a 56°C .
131 Posteriormente esta solução foi centrifugada a 13.000 g por 5 minutos. Em seguida
132 500 μL do sobrenadante foram incubados com 900 μL de NaCl 300mM e com 400 μL
133 de fenol por 30 minutos no rotor a temperatura ambiente. Após, sofreram uma
134 centrifugação a 13.000 g por 20 minutos. A fase aquosa foi coletada e incubada com
135 900 μL de etanol gelado (-20°C) por 30 minutos a -20°C . Uma nova centrifugação a
136 13.000 g por 30 minutos foi realizada ao término dessa incubação e o sobrenadante
137 desprezado. O *pellet* foi ressuspendido em 50 μL de TE [10 mM de Tris, pH 7,4 e 1
138 mM de EDTA, pH 8,0] a após, incubado com 5 μL de RNase por 15 minutos a 37°C .
139 Para se comprovar quantidade e qualidade do DNA extraído, 5 μL de cada amostra
140 foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1%, sendo corados com brometo
141 de etídio e visualizados sob luz ultravioleta.

142

143 Reação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção de FIV e FeLV

144 A detecção do genoma viral foi realizada através da amplificação de uma
145 região conservada do genoma dos vírus FIV e FeLV, utilizando oligonucleotídeos
146 específicos (FivF: 5'-CAAACAGTAAATGGAGCACC-3' e FivR: 5'
147 GCTTAAGATGACTCATTGCC-3', para FIV, e FelvF: 5'
148 ACTAACCAATCCCCACGC-3' e FelvR: 5'-ATGGCTGTCCACTAGAG-3' para
149 FeLV) que originam produtos de 589 e 450 pb para FIV e FeLV, respectivamente.

150 Os oligonucleotídeos utilizados no ensaio de PCR foram desenhados com base nas
151 seqüências dos genes *gag* de ambos FIV e FeLV, as quais estão disponíveis no banco
152 de dados do “National Center for Biotechnology Information” (NCBI;
153 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

154 As reações foram realizadas em termociclador utilizando o seguinte protocolo
155 inicial: um passo de desnaturação inicial de 5 min a 94°C, seguido de 35 ciclos de 1
156 min a 94°C (desnaturação), 1 min a 54°C (anelamento) e 1 min a 72°C (extensão), e
157 um passo final de 5 min a 72°C. A fim de aperfeiçoar a reação, eliminar bandas
158 inespecíficas e melhorar a qualidade da banda desejada, algumas variações foram
159 testadas. Foram testadas reações com diferentes temperaturas de anelamento dos
160 oligonucleotídeos (54, 56, 57, 58, 59 e 60°C), com acréscimo de dimetilsulfóxido
161 (DMSO; 5, 7 e 10%), e com variação na concentração de MgCl₂ (1 e 2 mM).

162 As condições ótimas de amplificação numa reação de 25µl para FIV foram as
163 seguintes: 100ng de DNA total extraído do sangue total; 1mM de MgCl₂; 0,2µM de
164 cada oligonucleotídeo; 5% de DMSO; 1U de Taq Polimerase; 10% de tampão de
165 PCR e 0,5µM de deoxinucleosídeos trifosfatos por reação. E as condições ótimas de
166 amplificação numa reação de 25µl para FeLV foram as seguintes: 100ng de DNA
167 total extraído do sangue total; 1mM de MgCl₂; 0,2µM de cada oligonucleotídeo; 1 U
168 de Taq Polimerase; 10% de tampão de PCR e 0,5mM de deoxinucleosídeos
169 trifosfatos por reação. Além disso, as condições de tempo e de temperatura foram
170 mantidas como descrito anteriormente, sendo a temperatura de anelamento fixada em
171 58°C.

172 Os produtos obtidos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose
173 (1,5%), corados com brometo de etídio e visualizados sob luz ultravioleta.

174 Controles positivos e negativos foram utilizados em cada conjunto de
175 amplificação (a cada 5 amostras clínicas). A sensibilidade da PCR foi determinada
176 utilizando diluições seriadas na base 10 do controle positivo até o menor limite de
177 detecção (Campos et al., 2009).

178

179 Sequenciamento dos produtos e análise filogenética

180 Foram seqüenciados três produtos de FeLV e um produto de FIV visando a
181 determinação da especificidade da PCR. Para isso foi utilizado o DYEnamic ET
182 terminators sequencing kit (GE Healthcare, Giles, United Kingdom), seguindo as
183 recomendações do fabricante. As seqüências de nucleotídeos foram determinadas por

184 uso de um sequenciador automático MegaBACE 500 (GE Healthcare). Cada produto
185 foi sequenciado 2 vezes em ambos os sentidos utilizando os oligonucleotídeos
186 descritos anteriormente. As seqüências obtidas foram analisadas utilizando os
187 softwares BioEditpackage 7.0.5, Vector NTI 8.0, e Sequence Scanner Version 1.10
188 (Copyright AppliedBiosystems, 2005). Posteriormente, a análise da homologia das
189 seqüências foi realizada utilizando o software BLAST e os alinhamentos foram
190 realizados utilizando o software Clustal W, versão 1.83 (Thompson et al., 1994). As
191 análises filogenéticas foram realizadas com o software MEGA 3 (Kumar et al., 2004)
192 e as árvores filogenéticas construídas a partir da metodologia de “neighbor-joining”
193 | utilizando Kimura-2 e “pairwise deletion” como parâmetros de análise.

194 Resultados

195 Dos 89 animais submetidos ao teste de PCR, 31 foram positivos para FIV,
196 representando 35% das amostras, enquanto que 25 foram positivos para FeLV
197 representando 28%. Destes animais positivos, 13 (15 %) foram positivos para os dois
198 vírus, configurando um quadro de co-infecção (Tab. 1). A aplicação da PCR para
199 FeLV obteve a amplificação de somente um fragmento de DNA. A Figura 1 mostra
200 uma fotografia de um gel de agarose a 1,5% em que foram aplicadas amostras
201 testadas nas PCRs. Nesta figura observam-se fragmentos de DNA de tamanho
202 compatível com o tamanho esperado dos fragmentos (Fig. 1). O sequenciamento do
203 produto da PCR para FIV também apresentou baixa qualidade e não foi possível
204 analisá-lo.

205 A PCR utilizada com os oligonucleotídeos de FIV teve como resultado a
206 amplificação de diferentes fragmentos de DNA, um do tamanho esperado e outros
207 fragmentos de tamanhos diferentes. Dos três produtos da PCR para FIV, um
208 apresentou alta identidade com as sequências do vírus depositadas no banco de dados
209 do NCBI, um apresentou baixa identidade com as sequências de FIV e o terceiro não
210 foi possível analisar pela baixa qualidade do sequenciamento.

211 Com o produto sequenciado de FeLV foi elaborada uma árvore filogenética, e
212 as amostras dentro do retângulo vermelho são as amostras que tiveram maior
213 identidade com o nosso produto (Fig. 2).

214 |

215 Discussão

216 No presente estudo foram padronizadas e otimizadas reações de PCR para
217 detecção de DNA proviral dos vírus FIV e FeLV em amostras de gatos domésticos
218 do município de Porto Alegre, RS. Como resultado do total de 89 amostras testadas,
219 31 (35%) amostras foram positivas para FIV, 25 (28%) foram positivas para FeLV,
220 sendo que 13 (15%) apresentaram-se positivas para os dois vírus.

221 Os resultados obtidos nesse trabalho foram comparados com resultados
222 obtidos por outros trabalhos realizados no Brasil (Tab. 2). Nestes estudos, todos ou
223 autores identificaram animais FIV positivos por uso de PCR. O presente estudo
224 mostra que a prevalência de animais positivos para FIV, na população estudada, foi
225 maior do que as prevalências encontradas por outros autores no estado de São Paulo
226 e na cidade de Belo Horizonte-MG (Lara et al. 2008; Teixeira et al. 2007), apesar
227 desse segundo ter sido realizados com animais de rua e, por isso, esperava-se um
228 resultado maior. O maior nível de detecção do DNA proviral de FIV encontrado no
229 presente estudo pode ser devido a diferenças na sensibilidade das técnicas de
230 detecção utilizadas nos diferentes trabalhos. Por outro lado, os nossos resultados são
231 semelhantes aos resultados obtidos por Caldas et al. (2000), que analisaram amostras
232 de animais com sinais clínicos de imunodeficiência provenientes de Porto Alegre e
233 da Região Sul do estado do Rio Grande do Sul e detectaram 37,5 % de animais FIV
234 positivos. Porém, no estudo aqui descrito, esperava-se encontrar uma frequência de
235 animais FIV positivos menor do que a encontrada por Caldas et al. (2000), uma vez
236 que as amostras analisadas neste trabalho foram coletadas de animais submetidos à
237 exame de sangue no Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias da Universidade
238 Federal do Grande do Sul, sem necessariamente apresentarem sintomas de
239 imunodeficiência.

240 Já para FeLV, a prevalência de animais positivos encontrada no presente
241 estudo foi maior do que a encontrada por Barbosa et al. (2001), os quais detectaram
242 FeLV em gatos de Uberlândia-MG através do uso de um ELISA. Por outro lado, a
243 frequência de animais FeLV positivos encontrada aqui foi menor do que as
244 prevalências encontradas por Meinerz et al. (2010), os quais avaliaram a presença do
245 vírus, por imunofluorescência indireta, em gatos da Zona Sul do Estado do Rio
246 Grande do Sul e por Teixeira et al. (2007), que detectaram FeLV por ELISA em
247 amostras de gatos em diferentes municípios do Estado de Minas Gerais. A maior
248 frequência de animais FeLV positivos descrita nesses estudos, em comparação com

249 os nossos resultados, provavelmente se deu porque nestes trabalhos os animais
250 testados eram provenientes de locais com condições higiênicas precárias ou
251 provenientes da rua e, por isso, estes seriam mais susceptíveis à infecção pelo FeLV.

252 A amostra de FeLV sequenciada nesse trabalho apresentou maior identidade
253 com amostras do subtipo B, descritas por Coelho et al. (2008), do que com outras
254 amostras virais utilizadas no alinhamento de sequencias. Além disso, os trabalhos
255 que descrevem a distribuição dos subtipos de FeLV circulantes no Brasil indicam
256 que o subtipo B foi o único encontrado, o que vai de encontro ao nosso achado.
257 Porém, para um maior esclarecimento sobre o subtipo de maior prevalência no
258 Estado do Rio Grande do Sul, será necessário que um maior número de amostras seja
259 submetida ao sequenciamento e alinhamento de nucleotídeos.

260 Este trabalho demonstrou a presença de ambos os vírus em 13 (15%) dos
261 animais testados, o que evidencia que estes estavam desenvolvendo uma co-infecção
262 no momento das coletas das amostras de sangue. A co-infecção por FIV e FeLV é
263 um fato que ainda não havia sido demonstrado no Estado do Rio Grande do Sul, e
264 deve receber uma atenção especial, pois gatos infectados com FIV e FeLV podem
265 apresentar a SIDA de forma mais precoce. (Pedersen et al., 1990)

266 É importante a realização do diagnóstico definitivo e diferencial para essas
267 duas infecções, pois a partir do diagnóstico podem ser estabelecidas medidas de
268 controle da disseminação viral para outros animais. Por exemplo, em abrigos para
269 animais abandonados, o isolamento de animais infectados com esses vírus poderia
270 ser realizado para conter a disseminação deles pela população ali existente. Para
271 humanos, é importante o controle dessas infecções, pois gatos FIV ou FeLV
272 positivos podem se tornar reservatórios de agentes de zoonoses. Porém, gatos FIV ou
273 FeLV positivos não apresentam riscos grandes para seus donos desde que criados em
274 regime sem acesso às ruas.

275 Ambas as PCRs desenvolvidas nesse trabalho foram eficientes na
276 amplificação dos fragmentos de DNA proviral de FIV e FeLV. Porém, a PCR
277 desenvolvida para FIV necessita ser otimizada. Os oligonucleotídeos desenhados
278 para essa técnica anelaram no DNA proviral do FIV, mas também em regiões do
279 genoma felino e por isso esta PCR gerou algumas bandas inespecíficas que poderiam
280 confundir o resultado. Para melhorar esse aspecto, serão desenhados novos pares de
281 oligonucleotídeos para a realização de uma nested-PCR para aumentar a
282 especificidade do diagnóstico de FIV. Assim, as PCRs aqui descritas poderiam ser

283 aplicadas como uma alternativa de diagnóstico por se tratarem de um método rápido,
284 com alta sensibilidade e especificidade e um baixo custo.

285 |

286 Conclusões

287 Neste trabalho, foram detectadas altas taxas de animais infectados pelo vírus
288 da imunodeficiência felina e pelo vírus da leucemia felina, bem como casos de co-
289 infecção em gatos domésticos no município de Porto Alegre, Rio Grande do Sul.

290 |

291 Ilustrações

292

293

		PCR			
		Total	FIV	FeLV	FIV e FeLV
Amostras de	Nº	89	31	25	13
sangue total	%	100	35	28	15

294

295 Tabela 1. Ocorrência do vírus da imunodeficiência felina e do vírus da leucemia
296 felina em gatos provenientes do município de Porto Alegre, testados através de PCR.

297 |

298

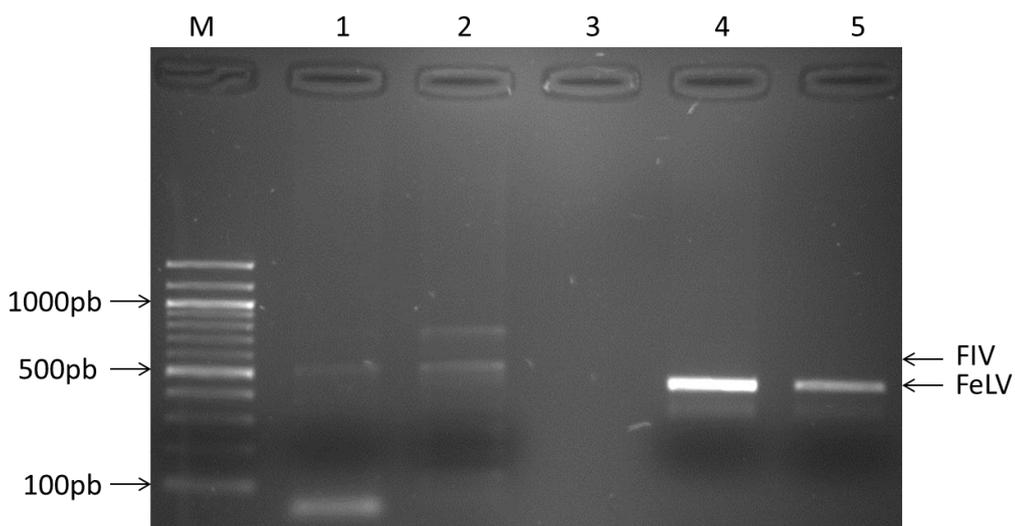
Local – Referência (ano)	FIV	Ensaio	FeLV	Ensaio	Co-infecção
Pelotas e Rio Grande – Meinerz et al. (2010)	-	-	38.3%	IFI	-
São Paulo, SP - Lara et al. (2008)	14,7%	PCR	-	-	-
Belo Horizonte, MG – Teixeira et al. (2007)	4,14%	PCR	32,5%	ELISA	-
Porto Alegre, RS - Caldas et al. (2000)	37,5%	PCR	-	-	-
Uberlândia, MG - Barbosa et al. (2001)	-	-	12,59%	ELISA	-
Porto Alegre, RS – Finoketti et al. (2011)	34%	PCR	30%	PCR	17%

299

300 Tabela 2. Comparação entre os resultados de detecção de FIV e FeLV obtidos nesse
 301 estudo e os resultados obtidos por outros autores em diferentes regiões do Brasil.

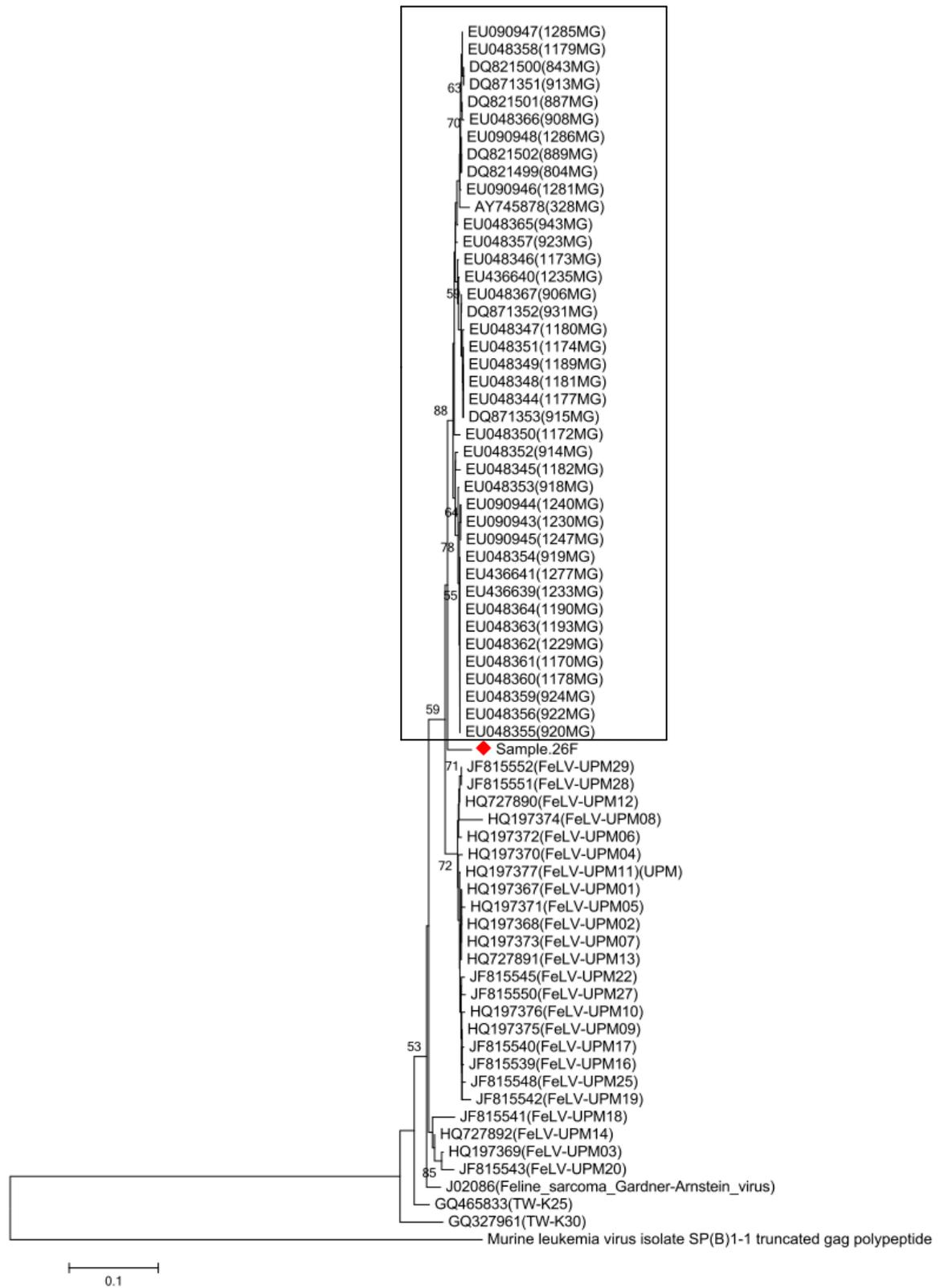
302

303



304

305 Figura 1. Produtos visualizados em gel de agarose 1,5% com fragmentos de
306 tamanhos correspondentes ao número de pb esperados após a PCR pra FIV (598
307 pb's) e FeLV (498 pb's). O poço M representa o marcador de peso molecular de
308 100pb, o poço 1 representa a amostra DOA 290, o poço 2 representa a amostra DOA
309 291, o poço 3 representa a amostra D 90,o poço 4 a amostra 1292 e o poço 5 a
310 amostra D172. Os poços 1 e 2 representam amostras positivas para FIV, os poços 4 e
311 5 representam amostras positivas para FeLV, e, o poço 3 uma amostra negativa para
312 os dois vírus.



313

314 Figura 2. Árvore filogenética com a amostra de FeLV sequenciada. Marcado pelo

315 retângulo preto as amostras que tem maior identidade com a amostra sequenciada (◆

316 Sample 26F)

317

318 Agradecimentos

319 O autor gostaria de agradecer à Profa. Luciana de Almeida Lacerda do Laboratório
320 de Análises Clínicas do Hospital Veterinário da UFRGS, pela coleta das amostras, e
321 aos demais amigos do Laboratório de Virologia da UFRGS pelo apoio.

322 |

323 Referências Bibliográficas

- 324 BARBOSA F. C.; CHRISTIANINE M. P. T.; WALDEMARIN K. C.
325 A. Prevalência de leucemia felina em gatos domésticos de Uberlândia – MG.
326 *Arq. Ciên. Vet. Zool. UNIPAR*, 5(2) : p. 207-211, 2001.
- 327 BARR M. C.; OLSEN C. W.; SCOTT F. W. Moléstias virais felinas
328 In: ETTINGER S. J.; FELDMAN E. C. (Ed) *Tratado de medicina interna*
329 *veterinária*. 4 ed. São Paulo: Manole, v. 1, p. 599-606, 1997.
- 330 BROWN W.E.; OLMSTED R.A.; MARTENSON J.S.; O.BRIEN S.J.
331 Exposure to FIV and FIPV in wild and captive cheetahs. *Zoo Biology*.
332 12:135-142, 1993.
- 333 CAMPOS, F.S.; FRANCO, A.C.; HÜBNER, S.O.; OLIVEIRA, M.T.;
334 SILVA, A.D.; ESTEVES, P.A.; ROEHE, P.M.; RIJSEWIJK, F.A. High
335 prevalence of co-infections with Bovine herpesvirus 1 and 5 found in cattle in
336 southern Brazil. *Vet. Microbiol., Netherlands*, v. 139, p.67-73, 2009.
- 337 CAXITO F.A.; COELHO F.M.; OLIVEIRA M.E.; RESENDE M.
338 Phylogenetic analysis of feline immunodeficiency virus strain from State of
339 Minas Gerais, Brazil. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 58:1222-1225, 2006.
- 340 CALDAS A.P.F.; LEAL E.S.; SILVA E.F.A.; RAVAZZOLO A.P. Detecção
341 do provírus da imunodeficiência felina em gatos domésticos pela técnica de reação
342 em cadeia da polimerase. *Pesq. Vet. Bras.*20:20-25, 2000.
- 343 COELHO F. M.; BOMFIM M. R. Q.; CAXITO F. A.; RIBEIRO N. A.;
344 LUPPI M. M.; COSTA E. A.; OLIVEIRA M. E.; DA FONSECA F.G.; RESENDE
345 M. *Journal of General Virology* 89, 2799–2805, 2008.
- 346 COSTA, U. M.; REISCHAK, D.; SCHMITT, A. C.; RENCK, L.;
347 OLIVEIRA, E. S.; FERREIRO, L. Detection of feline leukemia virus (FeLV)
348 antigen from 1992 to June 2000 by indirect immunofluorescence test in Porto
349 Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. *Virus Reviews & Research*, v. 5, p. 94,
350 2000.
- 351 DUARTE A. & TAVARES L. Phylogenetic analysis of Portuguese
352 feline immunodeficiency virus sequences reveals high genetic diversity. *Vet.*
353 *Microbiol.* 114:25-33, 2005.
- 354 HOHDATSU T.; MOTOKAWA K.; USAMI M.; AMIOKA M.;
355 OKADA S.; KOYAMA H. Genetic subtyping and epidemiological study of
356 feline immunodeficiency virus by nested polymerase chain reaction-

- 357 restriction fragment length polymorphism analysis of the *gag* gene. *J. Virol. Methods*
358 70:107-111, 1998.
- 359 HOOVER, E.A. & MULLINS, J.I. Feline leukemia virus infection and
360 diseases. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.199, p.1287-1297, 1991.
- 361 IYER D.; E. LEROY B. E.; LATIMER K. S.; MOORE H. Feline Leukemia
362 Virus Infection - A Review. Veterinary Clinical Pathology Clerkship Program,
363 2005. Disponível em: <http://www.vet.uga.edu/VPP/clerk/iyer/index.php>. Acessado
364 em: 25 jul. 2011.
- 365 KAKINUMA S.; MOTOKAWA K.; HOHDATSU T.; YAMAMOTO J.K.;
366 KOYAMA H.; HASHIMOTO H. Nucleotide sequence of feline immunodeficiency
367 virus: classification of Japanese isolates into two subtypes which are distinct from
368 non-japanese subtypes. *J. Virol.* 69:3639-3646, 1995.
- 369 KUMAR, S.; TAMURA, K.; NEI, M. MEGA3: integrated software for
370 molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief. Bioinform.*
371 5, 150-163, 2004.
- 372 LARA V. M.; SUELI A. TANIWAKI S. A.; ARAÚJO JR J. P.
373 Caracterização filogenética de amostras do vírus da imunodeficiência felina (FIV) do
374 Estado de São Paulo *Pesq. Vet. Bras.* 27(11):467-470, 2007.
- 375 LOAR A.S. Feline leukemia virus immunization and prevention. *Veterinary*
376 *Clinics of North America: small animal practice, Philadelphia*, v. 23, n. 1, p. 193-
377 211, 1993.
- 378 LUTZ, H. Feline retroviruses: a brief review. *Vet. Microbiol.* v.23, p.131-146,
379 1990.
- 380 MEINERZ A. R. M.; ANTUNES T. A.; SOUZA L. L.; NASCENTE P. S.;
381 FARIA R. O.; CLEFF M. B.; GOMES F. R.; NOBRE M. O.; REISCHAK D.;
382 SCHUCH L. F. D.; MEIRELES M. C. A. Frequência do vírus da leucemia felina
383 (vlf) em felinos domésticos (*felis catus*) semidomiciliados nos municípios de
384 Pelotas e Rio Grande. *Ci. Anim. Bras., Goiânia*, v. 11, n. 1, p. 90-93, jan./mar. 2010
- 385 MIYAZAWA, T. Infections of feline leukaemia virus and feline
386 immunodeficiency virus. *Front. Biosci.*, v.7, p.504- 518, 2002.
- 387 PECORARO M.R.; TOMONAGA K.; MIYAZAWA T.; KAWAGUCHI Y.;
388 SUGITA S.; TOHYA Y.; KAI C.; ETCHEVERRIGARAY M.E.; MIKAMI T.
389 Genetic diversity of Argentina isolates of feline immunodeficiency virus. *J. Gen.*
390 *Virol.* 77:2031-2035, 1996.

391 PDERSEN N. C.; TORTEN M.; RIDEOUR B.; SPARGER E.;
392 TONACHINI T.; LUCIW P. A.; ACKLEY C.; LEVY N.; YAMAMOTO J.
393 Feline leukemia virus infection as a potentiating cofactor for the primary and
394 secondary stages of experimentally induced feline immunodeficiency virus
395 infection. *J. virol.* V. 64(2) p. 598-606

396 PEDERSEN N.C.; HO E.W.; BROWN M.L.; YAMAMOTO J.K.
397 Isolation of a T lymphotropic virus from domestic cats with an
398 Immunodeficiency-like Syndrome. *Science* 235:790-793, 1987.

399 PONTIER, D.; FROMONT, E.; COURCHAMP, F.; ARTOIS, M.;
400 YOCCOZ, G. Retroviruses and sexual size dimorphism in domestic cats
401 (*Felis catus*). *Proceedings of the Royal Biological Society*, v. 265, p. 167-173,
402 1998.

403 SODORA D.L.; SHAPER E.G.; KITCHELL B.E.; DOW S.W.;
404 HOOVER E.A.; MULLINS J.I. Identification of three feline
405 immunodeficiency virus (FIV) env gene subtypes and comparison of the
406 FIV and human immunodeficiency virus type 1 evolutionary patterns. *J.*
407 *Virology*. 68:2230-2238, 1994.

408 STEINRIGL A. & KLEIN D. Phylogenetic analysis of feline
409 immunodeficiency virus in Central Europe: a prerequisite for vaccination and
410 molecular diagnostics. *J. Gen. Virol.* 84:1301-1307, 2003.

411 TEIXEIRA B.M.; RAJÃO D.S.; HADDAD J.P.A; LEITE R.C.; REIS J.K.P.
412 Ocorrência do vírus da imunodeficiência felina e do vírus da leucemia felina em
413 gatos domésticos mantidos em abrigos no município de Belo Horizonte *Arq. Bras.*
414 *Med. Vet. Zootec.*, v.59, n.4, p.939-942, 2007.

415 THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. CLUSTAL W:
416 improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through
417 sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice.
418 *Nucleic Acids Res.* 22, 4673–4680, 1994.

419 YAMAMOTO J.K.; SPARGER E.; HO E.W.; ANDERSON P.R.;
420 O'CONNOR T.R.; MANDELL C.P.; LOWENSTINE L.; MUNN R.;
421 PEDERSEN N.C. Pathogenesis of experimentally induced Feline
422 Immunodeficiency Virus infection in cats. *Am. J. Vet. Res.* 8:1246-1258,
423 1988.

424

4. Discussão e Perspectivas

No presente estudo foram padronizadas e otimizadas reações de PCR para detecção de DNA proviral dos vírus FIV e FeLV em amostras de gatos domésticos do município de Porto Alegre, RS. Como resultado do total de 89 amostras testadas, 31 (35%) amostras foram positivas para FIV, 25 (28%) foram positivas para FeLV, sendo que 13 (15%) apresentaram-se positivas para os dois vírus. A co-infecção por estes dois vírus está sendo demonstrada pela primeira vez em gatos do município de Porto Alegre.

Os resultados obtidos nesse trabalho foram comparados com resultados obtidos por outros trabalhos realizados no Brasil (Tab. 2). Os resultados aqui obtidos variaram em relação aos resultados obtidos por outros autores. Essa variação pode estar relacionada ao uso de diferentes técnicas de detecção do vírus ou às diferentes populações animais estudadas.

Foi possível analisar a sequência de um fragmento amplificado na PCR de FeLV. Esta análise demonstrou que a amostra de FeLV seqüenciada nesse trabalho apresentou maior identidade com amostras do subtipo B, descritas por Coelho et al. (2008), do que com outras amostras virais utilizadas no alinhamento de sequências. Além disso, os trabalhos que descrevem a distribuição dos subtipos de FeLV circulantes no Brasil indicam que o subtipo B foi o único encontrado, o que vai de encontro ao nosso achado. Porém, para um maior esclarecimento sobre o subtipo de maior prevalência no Estado do Rio Grande do Sul, será necessário que um maior número de amostras seja submetido ao sequenciamento e alinhamento de nucleotídeos.

Ambas as PCRs desenvolvidas nesse trabalho foram eficientes na amplificação dos fragmentos de DNA proviral de FIV e FeLV. Porém, a PCR desenvolvida para FIV deverá ser otimizada. Os oligonucleotídeos desenhados para essa técnica anelaram no DNA proviral do FIV, mas também em regiões do genoma felino e por isso esta PCR gerou algumas bandas inespecíficas que poderiam confundir o resultado. Para melhorar esse aspecto, serão desenhados novos pares de oligonucleotídeos para a realização de uma nested-PCR para aumentar a especificidade do diagnóstico de FIV. Além disso, um maior número de fragmentos amplificados em ambas as PCRs e nested PCRs serão submetidos ao sequenciamento

e análise comparativa dos nucleotídeos, para que possamos identificar quais são os subtipos virais circulantes na população estudada.

5. Referências Bibliográficas não presentes no artigo

ARJONA, A.; ESCOLAR, E; SOTO. I; BARQUERO, N.; MARTIN, D.; LUCIA, E. G. Seroepidemiological survey of infection by feline leukemia virus and immunodeficiency virus in Madrid and correlation with some clinical aspects. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 38, p. 3448-3449, 2000.

GENTILE G.; AYALA I.; PIETRA M. Infección por el virus de la inmunodeficiencia felina: estudio seroepidemiológico y clínico en Bologna (Italia), *Arch. Med. Vet.* 28(2): 153-156, 1996.

GREENE C.E. *Current Veterinary Therapy XII.12^a ed.*, W. B. Saunder, Philadelphia, 1995.

HARBOUR, D.A.; GUNN-MOORE, D.A.; GRUFFYDDJONES, T.J. ET AL. Protection against oronasal challenge with virulent feline leukaemia virus lasts for at least 12 months following a primary course of immunisation with LeukocellTM 2 vaccine. *Vaccine*, v.20, p.2866-2872, 2002.

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

ISHIDA T. & TOMODA I. Clinical staging of feline immunodeficiency virus infection, *Nippon Juigaku Zasshi* 52: 645-648, 1990.

LITTLE S.; SEARS W.; LACHTARA J.; BIENZLE D. Seroprevalence of feline leukemia virus and feline immunodeficiency virus infection among cats in Canada *Can Vet J.* 50(6): 644-648, 2009.

OLMSTED R.A.; BARNES A.K.; YAMAMOTO J.K.; HIRSCH V.M.; PURCELL R.H.; JOHNSON P.R. Molecular cloning of feline immunodeficiency virus. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 86:2448-2452, 1989.

O'NEIL L.L.; BURKHARD M.J.; HOOVER E.A. Frequent perinatal transmission of feline immunodeficiency virus by chronically infected cats. *J. Virol.* 70: 2894-2901, 1996.

RICHARDSON J.; MORAILLON A.; CRESPEAU F.; BAUD S.; SONIGO P.; PANCINO G. Delayed infection after immunization with a peptide from the transmembrane glycoprotein of the feline immunodeficiency virus. *J. Virol.* 72: 2406-2415, 1998.

SIEBELINK K.H.J.; TIJHAAR E., HUISMAN R.C.; HUISMAN W.; RONDE A.; DARBY I.H.; FRANCIS M.J.; RIMMELZWAAN G.F.; OSTERHAUS A.D.M.E. Enhancement of feline immunodeficiency virus infection after immunization with envelope glycoprotein subunit vaccines. *J. Virol.* 69: 3704-3711, 1995.

SMITH R.A.; REMINGTON K.M.; PRESTON B.D.; SCHINAZI R.F.; NORTH T.W. Novel point mutation at position 156 of reverse transcriptase from feline immunodeficiency virus confers resistance to the combination of (-)-b-2., 3.-dideoxy-3.-thiacytidine and 3.-azido-3.-deoxythymidine. *J. Virol.* 72:2335- 2340, 1998.

TOMPKINS M.B.; NELSON P.D.; ENGLISH R.V.; NOVOTNEY R.C. Early events in the immunopathogenesis of feline retrovirus infections. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 199: 1311-1315, 1991.

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

YAMAMOTO J. K.; SANOU M. P.; ABBOTT J. R.; COLEMAN J. K. Feline Immunodeficiency Virus Model for Designing HIV/AIDS Vaccines *Current HIV Research*, V. 8, N. 1, pp. 14-25(12) 2010.

6. Anexo - Disponível em: <http://www.vet.ufmg.br/editora/arquivo-brasileiro-de-medicina-veterinaria-e-zootecnia>

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia

(*Brazilian Journal of Veterinary and Animal Sciences*)

Política Editorial

O periódico *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* (*Brazilian Journal of Veterinary and Animal Science*), ISSN 0102-0935 (impresso) e 1678-4162 (online), é editado pela FEPMVZ Editora, CNPJ: 16.629.388/0001-24, e destina-se à publicação de trabalhos científicos sobre temas de medicina veterinária, zootecnia, tecnologia e inspeção de produtos de origem animal e áreas afins.

Os trabalhos encaminhados para publicação são submetidos à aprovação do Corpo Editorial, com assessoria de especialistas da área (relatores). Os trabalhos cujos textos necessitem de revisões ou correções serão devolvidos aos autores. Os aceitos para publicação tornam-se propriedade do *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* Os autores são responsáveis pelos conceitos e informações neles contidos. São imprescindíveis originalidade, ineditismo e destinação exclusiva à Revista.

Reprodução de artigos publicados: A reprodução de qualquer artigo publicado é permitida desde que seja corretamente referenciado. Não é permitido o uso comercial dos resultados.

A submissão dos trabalhos é feita exclusivamente on-line, no endereço eletrônico <www.abmvz.org.br>.

Tipos de artigos aceitos para publicação

Artigo científico. É o relato completo de um trabalho experimental. Baseia-se na premissa de que os resultados são posteriores ao planejamento da pesquisa. Seções do texto: Introdução, Material e Métodos, Resultados e Discussão e Conclusões. O número total de páginas não deve exceder a 15.

Relato de caso. Contempla principalmente as áreas médicas, em que o resultado é anterior ao interesse de sua divulgação ou a ocorrência dos resultados não é planejada. Seções do texto: Introdução, Casuística, Discussão e Conclusões (quando pertinentes). O número total de páginas não deve exceder a 10.

Comunicação. É o relato sucinto de resultados parciais de um trabalho experimental, dignos de publicação, embora insuficientes ou inconsistentes para constituírem um artigo científico. Levantamentos de dados (ocorrência, diagnósticos, etc.) também se enquadram aqui. Deve ser compacto, com no máximo seis páginas impressas, sem distinção das seções do texto especificadas para "Artigo científico", embora seguindo aquela ordem. Quando a comunicação for redigida em português deve conter um "Abstract" e quando redigida em inglês deve conter um "Resumo".

Preparação dos manuscritos para publicação

Os trabalhos devem ser redigidos em português ou inglês, na forma impessoal. Para ortografia em inglês recomenda-se o *Webster's Third New International Dictionary*. Para ortografia em português adota-se o *Vocabulário*

Ortográfico da Língua Portuguesa, da Academia Brasileira de Letras. Os trabalhos submetidos em inglês deverão conter resumo em português e vice-versa.

Os trabalhos e ilustrações deverão ser apresentados em Microsoft Word, folha no formato A4, fonte Times New Roman tamanho 12, espaço entre linhas 1,5, margens de 3cm, com páginas e linhas numeradas (numeração contínua).

Seções de um trabalho

Título. Em português e em inglês. Deve ser o resumo do resumo e não ultrapassar 100 dígitos.

Autores. Os nomes dos autores virão abaixo do título, com identificação da instituição a que pertencem. Deve estar indicado o autor para correspondência com endereço completo, telefone, fax e e-mail.

Resumo e Abstract. Devem conter no máximo 200 palavras em um só parágrafo. Não repetir o título. Cada frase é uma informação. Atenção especial às conclusões.

Palavras-chave e Keywords. No máximo cinco.

Introdução. Explicação concisa, na qual são estabelecidos brevemente o problema, sua pertinência, relevância e os objetivos do trabalho.

Material e Métodos. Citar o desenho experimental, o material envolvido, a descrição dos métodos usados ou referenciar corretamente os métodos já publicados. Não usar subtítulos.

Nos trabalhos que envolvam animais ou organismos geneticamente modificados deverá constar o número do protocolo de aprovação do Comitê de Bioética e/ou de Biossegurança.

Resultados. Apresentar clara e objetivamente os principais resultados encontrados.

Discussão. Discutir somente os resultados obtidos no trabalho.

Obs.: As seções Resultados e Discussão poderão ser apresentadas em conjunto.

Conclusões. As conclusões devem estar apoiadas nos dados da pesquisa executada.

Ilustrações. São tabelas e figuras. Toda ilustração que já tenha sido publicada deve conter, abaixo da legenda, dados sobre a fonte (autor, data) e a correspondente referência deve figurar na lista bibliográfica final.

Tabela. Conjunto de dados alfanuméricos ordenados em linhas e colunas. Usar linhas horizontais na separação do cabeçalho e no final da tabela. A legenda recebe inicialmente a palavra Tabela, seguida pelo número de ordem em algarismo arábico e é referida no texto como Tab., mesmo quando se referir a várias tabelas.

Figura. Qualquer ilustração constituída ou que apresente linhas e pontos: desenho, fotografia, gráfico, fluxograma, esquema etc. As legendas recebem inicialmente a palavra Figura, seguida do número de ordem em algarismo arábico e é referida no texto como Fig., mesmo se referir a mais de uma figura. As figuras devem ser enviadas em arquivo separado, extensão.jpg.

Agradecimentos. Devem ser concisamente expressados.

Referências bibliográficas. As referências devem ser relacionadas em ordem alfabética.

Citações bibliográficas

Citações no texto deverão ser feitas de acordo com ABNT/NBR 10520 de 2002. A indicação da fonte entre parênteses sucede à citação para evitar interrupção na sequência do texto, conforme exemplos:

- autoria única: (Silva, 1971) ou Silva (1971); (Anuário..., 1987/88) ou Anuário... (1987/88)
- dois autores: (Lopes e Moreno, 1974) ou Lopes e Moreno (1974)
- mais de dois autores: (Ferguson et al., 1979) ou Ferguson et al. (1979)
- mais de um trabalho citado: Dunne (1967); Silva (1971); Ferguson et al. (1979) ou (Dunne, 1967; Silva, 1971; Ferguson et al., 1979), sempre em ordem cronológica ascendente e alfabética de autores para trabalhos do mesmo ano.

Citação de citação. Todo esforço deve ser empreendido para se consultar o documento original. Em situações excepcionais pode-se reproduzir a informação já citada por outros autores. No texto, citar o sobrenome do autor do documento não consultado com o ano de publicação, seguido da expressão **citado por** e o sobrenome do autor e ano do documento consultado. Na listagem de referência, deve-se incluir apenas a fonte consultada.

Comunicação pessoal. Não fazem parte da lista de referências. Na citação coloca-se o sobrenome do autor, a data da comunicação, nome da Instituição à qual o autor é vinculado.

Referências bibliográficas

São adotadas as normas ABNT/NBR-6023 de 2002, simplificadas conforme exemplos:

Periódicos

ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL. v.48, p.351, 1987- 88.

FERGUSON, J.A.; REEVES, W.C.; HARDY, J.L. Studies on immunity to alphaviruses in foals. *Am. J. Vet. Res.*, v.40, p.5-10, 1979.

HOLENWEGER, J.A.; TAGLE, R.; WASERMAN, A. et al. Anestesia general del canino. *Not. Med. Vet.*, n.1, p.13-20, 1984.

Publicação avulsa

DUNNE, H.W. (Ed). *Enfermedades del cerdo*. México: UTEHA, 1967. 981p.

LOPES, C.A.M.; MORENO, G. Aspectos bacteriológicos de ostras, mariscos e mexilhões. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 14., 1974, São Paulo. *Anais...* São Paulo: [s.n.] 1974. p.97. (Resumo).

MORRIL, C.C. Infecciones por clostridios. In: DUNNE, H.W. (Ed). *Enfermedades del cerdo*. México: UTEHA, 1967. p.400-415.

NUTRIENT requirements of swine. 6.ed. Washington: National Academy of Sciences, 1968. 69p.

SOUZA, C.F.A. *Produtividade, qualidade e rendimentos de carcaça e de carne em bovinos de corte*. 1999. 44f.

Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

Documentos eletrônicos

QUALITY food from animals for a global market. Washington: Association of American Veterinary Medical College, 1995. Disponível em: <<http://www.org/critca16.htm>>. Acessado em: 27 abr. 2000.

JONHNSON, T. Indigenous people are now more combative, organized. *Miami Herald*, 1994. Disponível em: <<http://www.summit.fiu.edu/MiamiHerld-Summit-Related-Articles/>>. Acessado em: 5 dez. 1994.

Taxas de publicação

Taxa de submissão. A taxa de submissão de R\$30,00 deverá ser paga por meio de boleto bancário emitido pelo sistema eletrônico de submissão de artigos. Ao solicitar o boleto bancário, o autor informará os dados para emissão da nota fiscal. Somente trabalhos com taxa paga de submissão serão avaliados.

Taxa de publicação. A taxa de publicação de R\$55,00, por página impressa, será cobrada do autor indicado para correspondência, por ocasião da prova final do artigo. Se houver necessidade de impressão em cores, as despesas correrão por conta dos autores. A taxa de publicação deverá ser paga por meio de boleto bancário emitido pelo sistema eletrônico de submissão de artigos. Ao solicitar o boleto bancário, o autor informará os dados para emissão da nota fiscal.