

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

TESE DE DOUTORADO

CAUSAS DE MORTES EM GATOS NO SUL DO BRASIL

Porto Alegre

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

CAUSAS DE MORTES EM GATOS NO SUL DO BRASIL

Autora: Veronica Machado Rolim

Tese apresentada como requisito para a obtenção do grau de Doutor em Ciências Veterinárias, na área de concentração em Medicina Veterinária Preventiva e Patologia.

Orientador: David Driemeier

Coorientadora: Fernanda Vieira Amorim da Costa

Porto Alegre

Junho de 2017

CIP - Catalogação na Publicação

Rolim, Veronica Machado
Causas de morte em gatos no sul do Brasil /
Veronica Machado Rolim. -- 2017.
60 f.

Orientador: David Driemeier.
Coorientador: Fernanda Vieira Amorim da Costa.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de
Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre,
BR-RS, 2017.

1. felinos. 2. patologia. 3. óbito . 4.
infecciosas. I. Driemeier, David , orient. II.
Costa, Fernanda Vieira Amorim da, coorient. III.
Título.

VERONICA MACHADO ROLIM

CAUSAS DE MORTES EM GATOS NO SUL DO BRASIL

Aprovado em 2 de junho de 2017.

APROVADO POR:

Prof. Dr. David Driemeier

Orientador e Presidente da Comissão

Prof. Dr. Cláudio Severo Lombardo de Barros

Prof. Dr. Clairton Marcolongo Pereira

Profa. Dra. Luciana Sonne

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus, a todo mundo espiritual, especialmente aos espíritos de luz que sempre me acompanham e me intuem para elevar os meus pensamentos e trabalhar na luz. Gostaria também de fazer um agradecimento especial ao meu anjo da guarda, a Luci, que esta sempre nos meus pensamentos e orações. A Deus e aos espíritos de luz eu também agradeço a família que me foi dada, aos amigos que me cruzaram o caminho e as oportunidades que me foram ofertadas.

A minha família, que eu considero um presente, eu agradeço por tudo. Pelo carinho recebido desde que eu ainda era um pequeno serzinho no ventre da minha mãe. Aos meus pais Berenice e Odilon eu agradeço a infância feliz, cheia de boas lembranças que só me deixaram saudades. A eles eu agradeço os bons exemplos que ao longo do tempo moldaram o meu caráter e personalidade. Minha mãe Berenice é uma guerreira, mulher forte, talentosa, criativa e inteligente. O meu pai Odilon é a bondade em pessoa, generoso, afetivo e correto. Como se não bastasse pais maravilhosos eu ainda recebi o Luiz e a Walcy na minha vida, que são mais do que padrasto e madrastra, são meus amigos, meus confidentes, minha família. Ao meu irmão Henrique eu agradeço ter dado a nossa família a felicidade de ter o Kayodê, meu sobrinho amado. Agradeço também meus avós, meus velhinhos, que sempre rezaram e torceram muito por mim.

O Diogo Magnabosco foi o homem que eu escolhi pra minha vida, que me completa, que me inspira, que esta sempre ao meu lado, nas horas boas e também nas horas ruins, meu parceiro, meu cozinheiro preferido, amoroso, no coração dele é o melhor lugar onde eu poderia estar. Te amo.

Gostaria muito de agradecer ao Setor de Patologia Veterinária. Estou no SPV desde 2008, e nestes quase 10 anos construí a minha carreira profissional: graduação mestrado e doutorado. Foram anos de aprendizado e amadurecimento. Gostaria de agradecer em especial ao professor David, que com a sua energia e paixão pela profissão sempre entusiasmo e contagia todos os seus alunos a sua volta. Agradeço ao professor David todas as oportunidades, congressos, estágios nos EUA e Alemanha, que não são somente experiências acadêmicas, mas também de vida. Agradeço também aos professores Saulo e Luciana que juntamente com o professor David inspiram e formam tantos alunos, sempre com tanto entusiasmo e paixão.

A patologia também me deu grandes amigos, que eu vou carregar pra sempre na minha vida. Muitos deles já foram embora do SPV, mas a gente nunca esquece e apesar da distância, quando se encontra parece que foi ontem que estava na sala de necropsia ou no microscópio rindo junto. A Cintia é a minha amiga que foi paixão a primeira vista, a minha fiel escudeira. Foram tantos os amigos, Flademir e Angélica (e cia), Renata Casagrande, Paula Rodrigues de Almeida, Fabiana Boabaid, Luiz Gustavo de Oliveira, Welden Panziera, Gisele Boss e Cláudio Laisse. Quero agradecer todos os colegas, estagiários, técnicos, terceirizados e amigos do SPV que sempre trabalharam como uma verdadeira equipe, na parceria, obrigada por tudo. Agradecimento especial ao meu

parceiro de felinos, Fernando Argenta, sempre prestativo e pronto para ajudar, muito obrigada mesmo.

Gostaria de agradecer também a minha co-orientadora Fernanda Amorim, que com o seu entusiasmo e paixão pelos gatos me co-orientou no mestrado e doutorado, sempre com boas ideias, foi parceira para todas as horas. Agradeço também a todos os veterinários, alunos e residentes do HCV da UFRGS que encaminharam casos para o trabalho.

Quero agradecer de modo geral a UFRGS, que durante estes 10 anos foi a minha segunda casa. Eu que fui criada dentro desta casa, filha e neta de funcionários da UFRGS, me sinto em casa. Recentemente fui chamada num concurso como veterinária da UFRGS e agradeço todos os dias por trabalhar nesta instituição que eu tanto amo e acredito. Tudo o que eu mais quero é poder retribuir pelos menos um pouco de tudo que me foi dado. Luci, obrigada por mais esta.

RESUMO

A intensificação da criação de felinos em todo o mundo demandam uma ampliação e aprofundamento dos conhecimentos da clínica e patologia de doenças infecciosas que acometem os gatos. Entretanto, existe uma escassez de informações sobre doenças infecciosas que acometem os gatos do Brasil, especialmente da região sul. Esta tese de doutorado teve como objetivo realizar um levantamento das principais causas de morte em gatos, além da caracterização anatomopatológica e identificação de agentes infecciosos em tecidos e células de gatos através da técnica de imuno-histoquímica (IHQ) e imunocitoquímica (ICQ). O primeiro artigo teve como objetivo determinar as principais causas de morte em gatos na região Sul do Brasil, através de um estudo retrospectivo, de 2000 a 2015. Foram realizadas um total de 1753 necropsias de felinos domésticos, destas 1364 (77,8%) foram conclusivas e 389 foram inconclusivos (22,2%). As categorias mais prevalentes foram: neoplasmas (20%), doenças infecciosas/parasitárias (17,8%), doenças do sistema digestório (14,1%), traumatismos (13,4%), doenças do sistema urinário (11,4%), doenças do sistema cardiovascular (6,9%), doenças do sistema respiratório (5,8%) e outras (8,5%). As causas de morte mais frequentes incluíram: politraumatismo (13,4%), linfoma (8,8%) e peritonite infecciosa felina (7,9%). O segundo artigo teve como objetivo fazer a identificação por ICQ dos antígenos do coronavírus felino (FCoV) em macrófagos e monócitos fixados em formol e embebidos em parafina a partir de derrame e sangue como alternativa diagnóstica *ante mortem* da peritonite infecciosa felina. Foram selecionados para o estudo gatos com pelo menos um dos seguintes sinais clínicos: derrame em cavidades abdominal e/ou torácica e/ou pericárdica, temperatura retal acima de 40°C, icterícia, linfadenomegalia, e sinais clínicos oftálmicos e neurológicos. Foram recebidas 25 amostras provenientes de derrames. Dessas, 16 tiveram marcação positiva no interior de macrófagos. Nove desses casos, foram confirmados pela necropsia. De 17 amostras de sangue total, 3 amostras tiveram marcação positiva no interior de monócitos; dois desses casos foram confirmadas na necropsia. O teste de ICQ anti-FCoV foi sensível e específico como método diagnóstico ante mortem da PIF. O terceiro artigo teve como objetivo descrever cinco casos de gatos apresentando cardiomiopatia hipertrófica e miocardite associadas ao vírus da imunodeficiência felina (FIV). Na necropsia, os cinco gatos apresentaram o coração acentuadamente aumentado de tamanho, por hipertrofia ventricular esquerda, e múltiplos focos brancos coalescentes no miocárdio e no epicárdio. Microscopicamente, no miocárdio, havia infiltrado multifocal acentuado composto por linfócitos, alguns macrófagos, neutrófilos e plasmócitos. Na IHQ para FIV houve intensa imunomarcagem no citoplasma e no núcleo, principalmente de linfócitos e no citoplasma de ocasionais macrófagos no miocárdio. O infiltrado inflamatório caracterizou-se por linfócitos T e macrófagos, o que foi evidenciado por imunomarcagem específica para essas células. Este trabalho demonstra a importância das doenças infecciosas/parasitárias, consideradas como causa de morte em gatos, demonstra a utilidade da técnica de identificação de infecção pelo vírus da imunodeficiência felina em células inflamatórias no miocárdio de gatos com miocardite e cardiomiopatia hipertrófica.

Palavras-chave: Gatos, mortalidade, patologia, doenças infecciosas

ABSTRACT

The increase of cat breeding worldwide demands an expansion in qualified information on clinic clinical and pathological aspects of feline infectious diseases. There is, however, a lack of information on the infectious diseases that affect cats in Brazil, especially in the Southern region. This doctoral thesis aimed to survey of the main causes of death caused in cats, as well as the anatomopathological characterization of tissue response and identification of infectious agents in the tissues and cells through immunohistochemistry (IHC) and immunocytochemistry (ICH). Three articles were written. The first one aimed to determine the main causes of death in cats in southern Brazil, through a retrospective study, from 2000 to 2015. A total of 1,753 domestic feline necropsies were reviewed, from which 1,364 (77.8%) had a conclusive diagnosis and 389 were inconclusive (22.2%). The most prevalent categories were neoplasms (20%), infectious/parasitic diseases (17.8%), diseases of the digestive system (14.1%), traumatism (13.4%), diseases of the urinary system (6.9%), diseases of the respiratory system (5.8%) and others (8.5%). The most frequent causes of death included multiple trauma (13.4%), lymphoma (8.8%) and feline infectious peritonitis (7.9%). Lymphoma (8.8%) and feline infectious peritonitis (7.9%). The second article aimed to tests and alternative antemortem diagnostic method to identified cats with feline infectious peritonitis feline coronavirus (FCoV) antigens; the method consists of applying ICH to macrophages and monocytes sampled from effusion and blood, fixed in formalin and embedded in paraffin. Cats with at least one of the following clinical signs were selected for being tested: cavitary (abdominal and/or thoracic and/or pericardial) effusion, rectal temperature above 40 ° C, jaundice, enlargement of lymph nodes, clinical ophthalmic and neurological signs. Twenty-five samples from effusions were received, of which 16 had positive marking within macrophages, 9 of which were confirmed by necropsy examination. Seventeen samples consisted of whole blood, from these, 3 samples had positive staining within monocytes and two cases were confirmed by postmortem examination. The anti-FCoV ICQ test was sensitive and specific as a PIF antemortem diagnostic method. The second article aimed to identify by ICQ the feline coronavirus (FCoV) antigens in macrophages and monocytes fixed in formalin and embedded in paraffin from effusion and blood as a diagnostic alternative antemortem of feline infectious peritonitis. Cats with at least one of the following clinical signs were selected: cavitary (abdominal and/or thoracic and/or pericardial) effusion, rectal temperature above 40°C, jaundice, enlargement of lymph nodes, clinical ophthalmic and neurological signs. Twenty-five samples from effusions were received, of which 16 had positive marking inside macrophages, 9 of which were confirmed by necropsy examination. 17 samples were also received from whole blood, these 3 samples had positive staining within monocytes and in 2 cases confirmed by postmortem examination. The anti-FCoV ICQ test was sensitive and specific as a PIF antemortem diagnostic method. The third article aimed to describe five cases of cats presenting hypertrophic cardiomyopathy and myocarditis associated with feline immunodeficiency virus (FIV). At necropsy, the five cats presented a markedly enlarged heart, marked left ventricular hypertrophy, multiple myocardial and epicardial whitening foci. Microscopically, in the myocardium, there was marked multifocal infiltrate composed of lymphocytes, macrophages, neutrophils and plasma cells. In the IHC for FIV there was intense immunostaining in the cytoplasm and nucleus, mainly of lymphocytes and occasional macrophages cytoplasm in the myocardium. The inflammatory infiltrate was predominantly composed of T lymphocytes and macrophages, evidenced by immunostaining. This work demonstrates the importance of

infectious/parasitic diseases, as the cause of death in cats, demonstrate the use of the IHC technique as an alternative antemortem diagnostic tool for FIP and the occurrence of feline immunodeficiency virus infection in inflammatory cells in the myocardium of cats with myocarditis and hypertrophic cardiomyopathy.

Key-words: Cats, mortality, pathology, infectious diseases.

LISTA DE FIGURAS**ARTIGO 2**

Figura 1.	49
Figura 2.	50

ARTIGO 3

Figura 1.	54
Figura 2.	55
Figura 3.	55
Figura 4.	55

LISTA DE TABELAS**ARTIGO 1**

Tabela 1.	27
Tabela 2.	28
Tabela 3.	29
Tabela 4.	30
Tabela 5.	31
Tabela 6.	32

ARTIGO 2

Tabela 1.	45
Tabela 2.	47
Tabela 3.	48

ARTIGO 3

Tabela 1.	53
Tabela 2.	54
Tabela 3.	55

LISTA DE ABREVIATURAS

AEC	3-amino-9-etilcarbazol
CCE	Carcinoma de Células Escamosas
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CFMV	Conselho Federal de Medicina Veterinária
DRC	Doença Renal Crônica
DTUIF	Doença do Trato Urinário Inferior dos Felinos
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
FCoV	Coronavirus Felino
FeLV	Vírus da Leucemia Viral Felina
FIV	Vírus da Imunodeficiência Felina
HCV	Hospital Clínico Veterinário
ICQ	Imunocitoquímica
IFD	Imunofluorescência Direta
IHQ	Imuno-histoquímica
NI	Não informado
PBS	Solução Tampão de Fosfato
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PIF	Peritonite Infeciosa Felina
SPV	Setor de Patologia Veterinária
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
VPN	Valor Preditivo Negativo
VPP	Valor Preditivo Positivo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. ARTIGO 1	14
3. ARTIGO 2	33
4. ARTIGO 3	51
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	58
6. REFERÊNCIAS	59

1. INTRODUÇÃO

O gato doméstico (*Felis catus*) foi domesticado pelo homem há mais de 9.000 anos atrás quando o homem passou a utilizar o gato como forma de controle de ratos (DRISCOLL et al., 2007). Desde então a relação entre homens e gatos se tornou cada vez mais estreita, principalmente nos últimos anos em que houve uma intensificação na criação de gatos. Com isso, aconteceu o avanço na clínica veterinária voltada para felinos o que tem demandado um aprofundamento no estudo das doenças que acometem os gatos. Segundo uma reportagem de 2014, encomendada pelo Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV), a população de gatos do Brasil é a segunda maior do mundo e que tende a dobrar nos próximos 10 anos, ultrapassando a população de cães.

O estudo das doenças infecciosas tem importância para todas as espécies de animais, pois abrange uma grande variedade de agentes infecciosos incluindo vírus, bactérias, protozoários, fungos, amebas e príons que podem causar doença clínica, podem ser transmitidos entre indivíduos da mesma espécie e em alguns casos de outras espécies, muitas vezes incluindo o homem.

Em um estudo europeu, as causas infecciosas foram as mais importantes dentre as causas de morte em felinos, representando 39,1% (MURRAY et al., 2008). Doenças de origem viral já foram descritas como a segunda causa de morte mais importante em felinos domésticos com até cinco anos de idade, (O'NEILL et al., 2015). Tais dados demonstram a importância das doenças infecciosas na criação de felinos e o grande impacto que representam na causa da morte desses animais. Entretanto, existe uma escassez de informações sobre as doenças infecciosas que acometem os felinos do Brasil, especialmente da região sul. Estes dados são importantes devido às diferenças

climáticas que interferem na epidemiologia das doenças e na distribuição de vetores. Outro fator que pode variar entre os países é a forma de criação, recursos que são investidos no cuidado dos gatos e disponibilidade de tecnologia em medicamentos, vacinas e veterinários especializados.

2. ARTIGO 1

Nesse item é apresentado o artigo intitulado “**Causas de morte em gatos no sul do Brasil: 1364 casos**” que será submetido a revista *Journal of Feline Medicine and Surgery*.

Causas de morte em gatos no sul do Brasil: 1364 casos

Veronica Machado Rolim¹, Fernando Froiner Argenta¹, Saulo Petinatti Pavarini¹, Fernanda Viera Amorim da Costa² and David Driemeier¹

¹Department of Veterinary Pathology of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil

²Department of Animal Medicine of the UFRGS, Porto Alegre, Brazil

Corresponding author:

Veronica Machado Rolim MSc, Department of Veterinary Pathology of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Bento Gonçalves Avenue, 9090, Porto Alegre 91540000, Brazil

E-mail: veronicarolim17@yahoo.com.br

Abstract

Objetivo: Determinar as principais causas de morte em gatos na região sul do Brasil.

Materiais e métodos: Os arquivos de necropsia de um Laboratório de patologia, situado em Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil foram revisados durante o período de 2000 a 2015, dados dos gatos foram compilados e os diagnósticos classificadas em categorias. *Resultados:* Foram realizadas um total de 1.753 necropsias de gatos, 1364 (77,8%) das quais tiveram diagnósticos conclusivos e 389 foram inconclusivos (22,2%). As categorias mais prevalentes foram: neoplasmas (20%), doenças infecciosas/parasitárias (17,8%), doenças do sistema digestório (14,1%), traumatismos (13,4%), doenças do sistema urinário (11,4%), doenças do sistema cardiovascular (6,9%), doenças do sistema respiratório (5,8%) e outras (8,5%). As causas de morte mais frequentes incluíram: politraumatismo (13,4%), linfoma (8,8%) e peritonite infecciosa felina (7,9%). Quando analisadas as faixas etárias, filhotes e jovens morrem principalmente devido a politraumatismos e peritonite infecciosa felina; adultos devido doença do trato urinário inferior dos felinos e linfoma; gatos maduros devido a linfoma e lipidose hepática; idosos por linfoma e carcinoma de glândula mamária, e geriátricos devido a linfoma e doença renal crônica. *Conclusão e relevâncias:* Os resultados obtidos neste trabalho esclarecem as principais causas de morte em gatos domésticos possibilitando com isso, que veterinários, criadores e tutores possam adotar medidas de prevenção e controle e determinar o prognóstico dos animais acometidos por essas enfermidades.

Palavras-chave: Doenças de gatos, mortalidade, patologia, estudo retrospectivo.

Introdução

O estudo das causas de morte fornece informações úteis em diferentes níveis pois auxilia na promoção da saúde através da prevenção e controle de doenças, direciona médicos veterinários na tomada de decisões na clínica, promove programas de melhoramento de criadouros e orienta futuros e atuais tutores, além de servir como uma importante fonte dinâmica de dados para pesquisa.^{1,2}

Estudos epidemiológicos que abordam a causa de morte ou morbidade de felinos já foram realizados em países como a Suécia,¹⁻⁴ Reino Unido,⁶⁻⁸ França⁵ e Canadá.⁹ Entretanto existe uma escassez de informação no que diz respeito aos felinos criados no Brasil.¹⁰ Estes dados são importantes porque existem diferenças climáticas que interferem na epidemiologia das doenças, na forma de criação, sobre os recursos que são investidos nos animais e na disponibilidade de tecnologia em medicamentos, vacinas e veterinários especializados.^{1,2}

O aumento da criação de gatos no Brasil demanda uma ampliação e aprofundamento dos conhecimentos da clínica e patologia de felinos. Sendo assim, este trabalho tem como objetivo fazer um estudo retrospectivo das causas de morte (ou razão para eutanásia) em felinos domésticos no sul do Brasil diagnosticados através do exame de necropsia e histopatologia.

Material e métodos

Os arquivos de necropsia de gatos do Setor de Patologia Veterinária da UFRGS (SPV-UFRGS) foram revisados no período de janeiro de 2000 a dezembro de 2015. Dados referentes a raça, sexo, idade e diagnósticos foram analisados e compilados. Os diagnósticos foram classificados nas seguintes categorias: “Neoplasmas”; “Doenças

infecciosas/parasitárias” e “Traumatismos”. Os diagnósticos que não se encaixaram em nenhuma destas 3 categorias, foram então classificados de acordo com o sistema afetado em: “Sistema digestório”, “Sistema urinário”; “Sistema cardiovascular” e “Sistema respiratório”. Outras doenças que não se enquadravam em nenhuma das categorias acima foram classificadas como “Outros diagnósticos”. Diagnósticos em que não foram observadas lesões, ou estas não eram compatíveis com a causa da morte, foram classificados como inconclusivos. As idades foram agrupadas em categorias etárias de acordo com a literatura, sendo considerados de 0 até 6 meses “filhotes”, de 6 meses a 2 anos “jovens”, de 3 a 6 anos “adultos”, de 7 a 10 “maduros”, de 11 a 14 anos “idosos” e mais de 15 anos “geriátricos”.¹¹

Resultados

Durante o período analisado, foram realizadas um total de 1753 necropsias de felinos domésticos, destas, 77,8% (1364/1753) foram conclusivas e 22,2% foram inconclusivos (389/1753). Em 90,3% (1232/1364) dos casos, a raça foi informada, destes, as mais representativas foram a sem raça definida (SRD) com 82,1% (1012/1232), seguido das raças Siamês com 9,5% (117/1232), Persa com 5,7% (70/1232) e a raça Himalaio com 1,4% (17/1232). Outras raças somam 1,5% (19/1232). Do total de casos em que o sexo foi registrado [93,8% (1280/1364)], 52,5% (672/1364) dos felinos eram machos e 47,5% (608/1280), fêmeas. As principais categorias de diagnósticos foram "Neoplasmas", representando 22,0% (300/1364), seguido por "Doenças infecciosas/parasitárias" com 17,8% (243/1364) e "Sistema Digestório" com 14,1% (193/1364). A classificação geral das categorias de diagnósticos de acordo com a faixa etária podem ser observadas na Tabela 1. As causas mais frequentes foram: politraumatismo [13,4% (183/1364)], linfoma [8,8% (120/134)] e peritonite infecciosa

felina (PIF) [7,9% (108/1364)]. A classificação com os 25 diagnósticos mais frequentes estão apresentados no Tabela 2, que contempla 77,9% (1062/1364) de todos os diagnósticos conclusivos. No Tabela 3 estão apresentadas as doenças mais importantes por categoria de faixa etária.

A categoria “Neoplasmas” e “Doenças infecciosa/parasitária” estão apresentadas, respectivamente nas Tabelas 4 e 5. As doenças do “Sistema digestório”, “Sistema urinário”, “Sistema cardiovascular” e “Sistema respiratório”, estão apresentadas no Tabela 6. A categoria “traumatismos” (n=183) foi a terceira categoria mais importante, entretanto teve o diagnóstico mais frequente entre todas as causas de morte. Nesta categoria estão incluídos os politraumatismos causados por atropelamentos por veículos automotivos, quedas, ataque por cães e agressões de humanos. Na categoria “Outros diagnósticos” (n=123) foram agrupados os casos referentes a doenças do sistema nervoso (n=10), tegumentar (n=10), endócrino (n=8), reprodutor (n=6), além de distúrbios do desenvolvimento (n=39), septicemias (n=15), iatrogênicos (n=9), intoxicações (n=6) e outros (n=13).

Discussão

Durante o período analisado, dos 1.364 diagnósticos de necropsia conclusivos de gatos, 20% dos casos foram decorrentes de “Neoplasmas”. De maneira semelhante, em outros estudos, os diagnósticos de neoplasmas também foram representativos, sendo a segunda,⁵ a terceira^{1,8,10} e a quarta⁴ principal causa de morte em gatos. O linfoma foi o neoplasma mais importante da categoria, representando 40% de todos os diagnósticos de neoplasmas. O linfoma ainda foi a segunda causa de morte em gatos, representando 8,8% de todos os diagnósticos conclusivos, além de ser a principal causa de morte em felinos maduros, idosos e geriátricos. Dados estes que corroboram com um estudo

européu, onde o linfoma foi o segundo neoplasma mais frequente.⁵ O carcinoma de glândula mamária foi o segundo neoplasma mais importante, representando 15% dos diagnósticos da categoria, e ainda, a segunda causa de morte mais frequente em animais idosos. De maneira semelhante, em outros estudos, observou-se que o carcinoma mamário foi o neoplasma mais comumente observado, demonstrando assim, a importância deste neoplasma como causa de morte em gatos.⁴⁻⁵ Tais resultados demonstram a importância dos neoplasmas como causa de morte em felinos que devem, provavelmente, estarem relacionados a maior longevidade dos felinos⁸ ou, ainda, associado a vírus capazes de induzir neoplasias como é o caso do Vírus da Leucemia Felina (FeLV) que induz linfoma,¹² podendo esta ser uma explicação para o linfoma ser o principal neoplasma, bem como a categoria neoplasma a mais representativa do estudo. Na região sul do Brasil, o FeLV é uma doença bastante prevalente,¹³ sendo assim, é provável que muitos destes linfomas estejam associados a esta retrovírose.

A categoria “Doenças infecciosas/parasitárias” foi a segunda categoria mais importante, semelhante ao que foi observado em outros estudos em que doenças infecciosas aparecem como a principal causa de morte ou doença em gatos, principalmente em jovens.^{5,6,8} De maneira semelhante, no presente trabalho, observou-se que a principal faixa etária desta categoria foram gatos jovens, seguido dos filhotes e adultos. Isto se deve, provavelmente, a não realização dos programas de vacinação e vermifugação assim como o acesso dos animais a rua e grandes aglomerações de animais.⁵ No presente estudo, PIF foi o principal diagnóstico entre as doenças infecciosas/parasitárias, representando 24,3% da categoria. Além disto, a PIF foi a terceira principal causa de morte em felinos, sendo responsável por 7,9% dos diagnósticos conclusivos de gatos. Em outros estudos semelhantes, a PIF também foi a principal doença infecciosa que causou a morte em gatos, sendo responsável pela morte

de 9% dos casos.⁴ No presente estudo, a PIF ainda foi a segunda causa mais importante de morte em gatos filhotes e jovens, semelhante ao observado em um outro estudo em que a maioria das mortes por PIF aconteceram com 1 ano de idade ou antes.¹ O FeLV é um vírus prevalente na nossa região,¹³ entretanto, não aparece como importante causa de morte em gatos, provavelmente porque a doença foi subdiagnosticada nos exames rotineiros de necropsia e histopatologia, uma vez que a doença exige a realização de exames complementares para o diagnóstico definitivo.

A categoria “Sistema digestório” foi a terceira mais importante, representando 14,1% dos diagnósticos conclusivos. De maneira semelhante, outros trabalhos também demonstraram a importância do sistema digestório como causa de morte em gatos, sendo considerada a mais representativa entre as doenças “não infecciosas”,⁷ a segunda principal causa de morte⁴ e a terceira principal causa de morte súbita em gatos.⁹ A lipidose hepática, com 19% dos casos, foi a principal causa de morte relacionada ao sistema digestório. Além disto, foi a segunda principal causa de morte em gatos maduros. A lipidose hepática é a principal doença hepatobiliar em felinos e tem sido relacionada a anorexia secundária a outras doenças e a alta incidência de obesidade na população felina.¹⁴ A colangio-hepatite foi a segunda doença mais frequente do sistema digestório, representando 15,7% dos casos da categoria. Em um estudo retrospectivo, a doença não foi considerada uma importante causa de morte em felinos, pois representou menos de 1% de todas as causas de mortes em felinos.¹⁵ Entretanto, a colangio-hepatite tem sido considerada uma causa frequente de insuficiência hepática em gatos.¹⁶

A quarta categoria mais importante foi “Traumatismos”, com 13,4% dos diagnósticos, sendo representada pelo politraumatismo, que foi o diagnóstico mais frequentemente observado entre todas as causas de morte em gatos. Além disto, o politraumatismo foi a principal causa de morte em gatos filhotes e jovens. Dados

semelhantes foram observados em um estudo em que o trauma também foi a principal causa de morte em felinos com menos de 5 anos de idade.⁸ Em um estudo brasileiro, traumatismos foram principal causa de morte em gatos.¹⁰ Da mesma forma, em uma pesquisa que investigou as causas de morte súbita em felinos,⁹ o trauma também esteve como a principal causa de morte. A importância dos politraumatismos observada neste trabalho provavelmente se deve ao modo de criação dos animais na região que permite o acesso a rua, possibilitando atropelamentos por automóveis e ataques por cães.

A categoria “Sistema urinário” foi a quinta mais importante, representando 11,4% dos diagnósticos conclusivos. Em outros trabalhos, também ficou demonstrada a importância das doenças relacionadas ao trato urinário dos felinos, uma vez que foi a primeira,¹ a segunda^{10,8} e a terceira doença mais representativa como causa de morte em gatos.^{4,5,7} Em uma pesquisa que avaliou as causas de morte súbita em gatos, problemas urinários foram a quarta causa mais frequente em felinos.⁹ Doenças relacionadas ao sistema urinário também foram as mais importantes em felinos com mais de cinco anos de idade.⁸ A doença do trato urinário inferior dos felinos (DTUIF) foi a doença mais importante da categoria, representando 30,7%. Além disto, foi a quarta doença mais importante entre todas as causas de morte em felinos, equivalendo a 6,7% do total. A DTUIF ainda, foi a principal causa de morte em felinos adultos. Em um estudo retrospectivo de DTUIF realizado no Brasil, esta foi responsável por 8,4% das mortes em felinos, parecendo estar mais associada a felinos machos, castrados, com sobrepeso e a falta de hábito em ingerir água.^{17,18} A doença renal crônica (DRC) foi a segunda doença mais importante da categoria, representando 17,3% das doenças do sistema urinário e ainda foi a segunda causa mais importante de morte em gatos geriátricos. Um estudo sugere que de 15 a 30% dos gatos com idade superior a 15 anos apresentem evidências de DRC, sendo mais frequente em gatos com idade superior a 12 anos.¹⁹

A categoria “Sistema cardiovascular” foi a sexta categoria mais importante, com 6,9% dos diagnósticos conclusivos. Para Olsen et al (2001), as doenças relacionadas ao coração foram a segunda causa mais importante de morte súbita em felinos, representando 20% dos diagnósticos. Em outros estudos, as doenças relacionadas ao sistema cardiovascular aparecem como a quinta causa mais importante de morte em gatos.^{1,7,8} A cardiomiopatia hipertrófica foi o principal diagnóstico de doenças do sistema cardiovascular, representando 20% da categoria. A cardiomiopatia hipertrófica é uma doença frequente em gatos, especialmente em machos adultos jovens e de meia idade, podendo estar relacionada a algumas raças como, por exemplo, o Maine Coon.²⁰ Entretanto, no presente trabalho, não foi possível correlacionar a cardiopatia com nenhuma raça específica.

A categoria “Sistema respiratório” foi a sétima mais importante, representando 5,8% dos diagnósticos conclusivos. De maneira semelhante, estudos demonstraram que o sistema respiratório foi a quarta^{7,8} e a quinta⁴ causa de morte mais importante em gatos. Olsen et al (2001) descrevem que o sistema respiratório foi a quarta categoria mais frequente como causa de morte súbita em gatos. A pneumonia foi o principal diagnóstico da categoria, representando 13,3% das doenças relacionadas ao sistema respiratório. Em um estudo europeu, pneumonias foram responsáveis por 6,5% das causas de morte em gatos.⁶ Embora as infecções do trato respiratório superior sejam comuns e importantes em gatos, as pneumonias são raras, exceto quando existe algum agente imunossupressor, sendo a *Pasteurella multocida* um organismo ocasionalmente associado a broncopneumonias secundárias e pleurites em gatos.²¹

Conclusões

Os resultados obtidos neste estudo permitem concluir que as principais causas de morte, ou razão para eutanásia em gatos diagnosticados pelo SPV-UFRGS foram os neoplasmas, doenças infecciosas/parasitárias, doenças do sistema digestório e traumatismo. Ao relacionar as causas de morte com a faixa etária, percebe-se que gatos filhotes e jovens morrem principalmente devido a politraumatismos e PIF; gatos adultos devido DTUIF e linfoma; gatos maduros por linfoma e lipidose hepática primária; idosos devido linfoma e carcinoma de mama e geriátricos por causa de linfoma e DRC. Os resultados obtidos neste trabalho esclarecem as principais doenças que levam os gatos domésticos à morte possibilitando que, com isso, veterinários, criadores e tutores possam adotar medidas de prevenção e controle e determinar o prognóstico dos animais acometidos por essas enfermidades.

Referências:

- 1 Egenvall A, Nodtvedt A, Häggström J, et al. **Mortality of Life-Insured Swedish Cats during 1999 –2006: Age, Breed, Sex, and Diagnosis.** *J Vet Intern Med* 2009; 23: 1175-1183.
- 2 Bonnett BN, Egenvall A. **Age Patterns of Disease and Death in Insured Swedish Dogs, Cats and Horses.** *J Comp Path* 2010; 142: 33-38.
- 3 Holst BS, Frössling J. **The Swedish breeding cat: population description, infectious diseases and reproductive performance evaluated by a questionnaire.** *J Feline Med Surg* 2009; 11: 793-802.
- 4 Egenvall A, Bonnett BN, Haggstrom J, et al. **Morbidity of insured Swedish cats during 1999-2006 by age, breed, sex, and diagnosis.** *J Feline Med Surg* 2010; 12: 948-959.

- 5 Moreau D, Cathelain P, Lacheretz A. **Comparative study of causes of death and life expectancy in carnivorous pets.** *Revue Méd Vét* 2003; 154: 127-132.
- 6 Cave TA, Thompson H, Reid SWJ, et al. **Kitten mortality in the United Kingdom: a retrospective analysis of 274 histopathological examinations (1986 to 2000).** *Vet rec* 2002; 151: 497-501.
- 7 Murray JK, Skillings E, Gruffydd-jones TJ. **A study of risk factors for cat mortality in adoption centres of a UK cat charity.** *J Feline Med Surg* 2008; 10: 338-345.
- 8 O'Neill DG, Church DB, McGreevy PD, et al. **Longevity and mortality of cats attending primary care veterinary practices in England.** *J Feline Med Surg* 2015; 17: 125-133.
- 9 Olsen TF, Allen AL. **Causes of sudden and unexpected death in cats: A 1 0-year retrospective study.** *Can Vet J* 2001; 42: 61-62.
- 10 Trapp SM, Iacuzio AI, Junior FAB, et al. **Causes of death and reasons for euthanasia in a hospital population of dogs and cats** [Article in Portuguese]. *Braz J Vet Res Anim Sci* 2010; 47: 395-402.
- 11 Vogt AH, Rodan I, Brown M, et al. **AAFP-AAHA Feline Life Stage Guidelines.** *J Am Anim Hosp Assoc* 2010; 46: 70-85.
- 12 Lutz H, Addie D, Belák S, et al. **Feline leukaemia. ABCD guidelines on prevention and management.** *J Feline Med Surg* 2009; 1: 565-574.
- 13 Meinerz ARM,¹ Antunes TA, Souza LL, et al. **Frequency of the virus of the feline leukemia (FeLV) in domestic felines (*felis catus*) semi-domiciled in the municipalities of Pelotas and Rio Grande** [Article in Portuguese]. *Ci Anim Bras* 2010; 11: 90-93.

- 14 Valtolina C, Favier RP. **Feline Hepatic Lipidosis.** *Vet Clin Small Anim* 2017; 47: 683–702.
- 15 Clark JEC, Haddad JL, Brown DC, et al. **Feline cholangitis: a necropsy study of 44 cats (1986-2008).** *J Feline Med Surg* 2011; 13: 570-576.
- 16 Cullen JM, Brown DL. **Hepatobiliary System and Exocrine Pancreas.** In Zachary JF, McGavin MD (Eds). *Pathologic basis of veterinary diseases.* 5th ed. St. Louis: Elsevier, 2013, pp 453-454.
- 17 Wouters F, Barros CSL, Wouters ATB, Kommers GD. **Feline Urologic Syndrome: 13 cases** [Article in Portuguese]. *Cienc Rural* 1998; 28: 497-500.
- 18 Newmann SJ. **Urinary System.** In Zachary JF, McGavin MD (Eds). *Pathologic basis of veterinary diseases.* 5th ed. St. Louis: Elsevier, 2013, pp 592-662.
- 19 Jepson RE. **Current Understanding of the Pathogenesis of Progressive Chronic Kidney Disease in Cats.** *Vet Clin Small Anim* 2016; 46: 1015–1048.
- 20 Miller LM, Vleet JFV, Gal A. **Cardiovascular system and lymphatic vessels.** In Zachary JF, McGavin MD (Eds). *Pathologic basis of veterinary diseases.* 5th ed. St. Louis: Elsevier, 2013, pp 542-591.
- 21 López A. **Respiratory system, mediastinum and pleura.** In Zachary JF, McGavin MD (Eds). *Pathologic basis of veterinary diseases.* 5th ed. St. Louis: Elsevier, 2013, pp 461-541.

Tabela 1: Apresentação geral dos diagnósticos de necropsia de felinos, no período de 2000 a 2015, de acordo com as categorias e faixa etária.

Categorias	Filhote	Jovem	Adulto	Maduro	Idoso	Geriátrico	NI	Total	%
Neoplasmas	3	40	43	44	70	25	75	300	22,0
Doenças infecciosas/parasitárias	42	67	41	16	7	5	65	243	17,8
Sistema Digestório	6	34	49	28	18	6	52	193	14,1
Traumatismos	21	43	22	9	6	0	82	183	13,4
Sistema Urinário	5	29	40	22	12	4	44	156	11,4
Sistema Cardiovascular	4	13	23	17	12	4	21	94	6,9
Sistema Respiratório	8	21	14	16	5	3	12	79	5,8
Outros diagnósticos	19	31	17	10	8	5	26	116	8,5
Total	108	278	249	162	138	52	377	1364	100

NI: não informado.

Tabela 2: Vinte e cinco diagnósticos de necropsias de felinos mais frequentes, no período de 2000 a 2015, o total de diagnósticos e a porcentagem (%)

	Diagnóstico	Total	%		Diagnóstico	Total	%
1	Politraumatismo	183	13,4	14	Úlcera gastroduodenal	22	1,6
2	Linfoma	120	8,8	15	CCE pele	21	1,5
3	PIF	108	7,9	16	Pancreatite	17	1,2
4	DTUIF	92	6,7	17	Elurostrongilose	17	1,2
5	Cardiomiopatia hipertrófica	60	4,4	18	Septicemia	15	1,1
6	Lipidose hepática primária	57	4,2	19	Micoplasmose	13	1
7	DRC	52	3,8	20	Toxocaríase	11	0,8
8	Colângio-hepatite	47	3,4	21	Complexo respiratório	11	0,8
9	Carcinoma de mama	45	3,3	22	Cardiomiopatia dilatada	11	0,8
10	Panleucopenia	41	3	23	Enterite	11	0,8
11	Pneumonia	40	2,9	24	Peritonite supurativa	11	0,8
12	Leucemia	31	2,3	25	Carcinoma de pâncreas	10	0,7
13	Pleurite supurativa	20	1,5	Parcial		1062	77,9
Total						1364	100

PIF: peritonite infecciosa felina; DTUIF: doença do trato urinário inferior; DRC: doença renal crônica; CCE: carcinoma de células escamosas; NI: não informado.

Tabela 3: Os dois diagnósticos mais frequentes em gatos por faixa etária.

Faixa etária	Frequência	
	1º	2º
Filhote	Politraumatismo	PIF
Jovem	Politraumatismo	PIF
Adulto	DTUIF	Politraumatismo
Maduro	Linfoma	Lipidose hepática
Idoso	Linfoma	Carcinoma de mama
Geriátrico	Linfoma	DRC

DTUIF: doença do trato urinário inferior dos felinos; PIF: peritonite infecciosa felina; DRC: doença renal crônica.

Tabela 4: Diagnósticos de necropsia de felinos, no período de 2000 a 2015, dos casos da categoria “Neoplasmas”, número de diagnósticos e porcentagem (%)

Neoplasmas	Número de casos	%
Hemolinfático	156	52,0
Linfoma	120	40,0
Leucemia	31	10,3
Outros	5	1,7
Glândula mamária	45	15,0
Carcinoma	45	15,0
Tegumentar	32	10,7
CCE	21	7,0
Hemangiossarcoma	5	1,7
Outros	6	2,0
Digestório	16	5,3
Carcinoma de pâncreas	10	3,3
Colangiocarcinoma	7	2,3
Carcinoma intestinal	5	1,7
Outros	4	1,3
Respiratório	13	4,3
Carcinoma pulmonar	9	3,0
CCE nasal	1	0,3
Outros	3	1,0
Outros	28	9,3
Total	300	100

CCE: carcinoma de células escamosas.

Tabela 5: Diagnósticos de necropsia de felinos, no período de 2000 a 2015, dos casos da categoria “Doenças infecciosas/parasitárias”, número de casos e porcentagem

Infecciosa/parasitária	Número de casos	%
PIF	108	44,4
Panleucopenia	41	16,9
Aelurostrongilose	17	7,0
Micoplasmose	13	5,3
Toxocaríase	11	4,5
Complexo respiratório	11	4,5
Criptococose	7	2,9
Esporotricose	6	2,5
Toxoplasmose	5	2,1
Miocardite/FIV	5	2,1
Tuberculose	2	0,8
Outras	17	7,0
Total	243	100

PIF: peritonite infecciosa felina; FIV: vírus da imunodeficiência felina.

Tabela 6: Diagnósticos de necropsia de felinos, no período de 2000 a 2015, dos casos das categorias “Sistema Digestório”, “Sistema Urinário”, “Sistema Cardiovascular” e “Sistema Respiratório”, número de casos e porcentagem

Sistemas	Número de casos	%
Digestório	193	100
Lipidose hepática primária	57	19,0
Colângio-hepatite	47	15,7
Úlcera gastroduodenal	22	7,3
Pancreatite	17	5,7
Enterite	11	3,7
Outros	39	13,0
Urinário	156	100
DTUIF	92	30,7
DRC	52	17,3
Outros	12	4,0
Cardiovascular	94	100
Cardiomiopatia hipertrófica	60	20,0
Cardiomiopatia dilatada	11	3,7
Outros	23	7,7
Respiratório	79	100
Pneumonia	40	13,3
Pleurite supurativa	20	6,7
Outros	19	6,3

DTUIF: doença do trato urinário inferior dos felinos, DRC: doença renal crônica.

3. ARTIGO 2

Nesse item é apresentado o artigo intitulado “**Identificação imunocitoquímica dos antígenos do coronavírus felino em macrófagos e monócitos fixados em formol e embebidos em parafina**” que será submetido a revista *The Veterinary Journal*.

Artigo original**Identificação imunocitoquímica dos antígenos do coronavírus felino em macrófagos e monócitos fixados em formol e embebidos em parafina**

V.M. Rolim ^{a,*}, F.F. Argenta ^a, C. Lorenzo ^a, S.P Pavarini ^a, F.V.A. Costa ^b, D. Driemeier ^a

^a *Setor de Patologia veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Avenida Bento Gonçalves, 9090, Bairro Agronomia, 91540-000, Brasil*

^b *Departamento de Medicina Animal, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Avenida Bento Gonçalves, 9090, Bairro Agronomia, 91540-000, Brasil*

* Corresponding author. Tel.: +55 51 33086107

E-mail address: veronicarolim17@yahoo.com.br (V.M. Rolim).

Abstract

A peritonite infecciosa felina (PIF) é uma das doenças infecciosas fatais mais importantes na clínica de gatos. Este trabalho tem como objetivo fazer a identificação imunocitoquímica (ICQ) dos antígenos do coronavírus felino (FCoV) em macrófagos e monócitos fixados em formol e embebidos em parafina a partir de efusão e sangue como alternativa diagnóstica ante morte da peritonite infecciosa felina. Foram selecionados para o estudo gatos com pelo menos um dos seguintes sinais clínicos: derrames cavitários (abdominal e/ou torácica e/ou pericárdica), temperatura retal acima de 40°C, icterícia, linfadenomegalia, sinais clínicos oftálmicos e neurológicos. Amostras de efusões e sangue total foram centrifugadas, fixadas em formol, processadas rotineiramente para histologia, emblocadas em parafina e submetidas ao teste de imunocitoquímica anti-FCoV. Durante o período analisado, receberam-se efusões e/ou sangue total de 35 gatos suspeitos de PIF. Foram recebidas 25 amostras derrames cavitários, destas, 16 tiveram marcação positiva em macrófagos, e 9 foram confirmadas como PIF confirmadas pelo exame de necropsia. Foram ainda recebidas 17 amostras provenientes de sangue total, destas, 3 amostras tiveram marcação positiva no interior de monócitos, sendo 2 casos confirmadas pelo exame de necropsia. O cálculo da sensibilidade e especificidade foi de 100%. O teste de imunocitoquímica anti-FCoV foi sensível e específico como método diagnóstico ante morte da PIF.

Palavras-chave: PIF; diagnóstico; patologia; in vivo; ICQ

Introdução

A peritonite infecciosa felina (PIF) é uma das doenças infecciosas fatais mais importantes na clínica de gatos. Coronavírus felino (FCoV) possui distribuição mundial na população de felinos, entretanto, apenas uma pequena parcela da população infectada desenvolve a PIF. A infecção de monócitos e macrófagos por cepas mutantes do FCoV é considerada o evento patogênico mais importante da doença (Hartmann, 2005; Addie et al., 2009; Pedersen, 2014).

O grande desafio no diagnóstico da PIF é distinguir animais portadores de FCoV, daqueles que apresentam a forma mutante do vírus replicando no interior de macrófagos e monócitos, uma vez que o FCoV é amplamente distribuído na população de felinos (Pedersen, 2014).

Os exames de detecção de anticorpos para o FCoV e a detecção do genoma viral através da reação da cadeia da polimerase (PCR) não tem demonstrado valor diagnóstico satisfatório, principalmente no que se refere a especificidade, uma vez que gatos clinicamente saudáveis tem apresentado sorologia e PCR positivos para o vírus (Hartmann, 2005; Addie et al., 2009). Desta forma, o diagnóstico *ante mortem* da PIF ainda representa um desafio para clínicos, patologistas e virologistas. Neste contexto, a imuno-histoquímica (IHQ) e imunocitoquímica (ICQ) surgem como uma importante alternativa diagnóstica, já que somente gatos com PIF tem apresentado carga viral suficiente para ser detectada no interior de macrófagos (Hartmann, 2005; Felten et al., 2016; Giori et al., 2011).

Atualmente, a técnica de ICQ e imunofluorescência direta (IFD) tem demonstrado ser uma ferramenta útil no diagnóstico de PIF efusiva (Felten et al, 2016; Giori et al., 2011, Litster et al., 2013), entretanto, existe uma lacuna no que diz respeito

ao diagnóstico *ante mortem* da PIF não efusiva (Kipar, 2014). Aliado a isto, a PIF possui um prognóstico desfavorável, muitas vezes com indicação da eutanásia, exigindo assim um método de detecção específico e confiável (Pedersen, 2014). Este trabalho tem como objetivo fazer a identificação ICQ dos antígenos do FCoV em macrófagos e monócitos fixados em formol e embebidos em parafina a partir de efusão e sangue como alternativa diagnóstica ante mortem da peritonite infecciosa felina.

Material e métodos

Seleção dos casos

Durante o período de julho de 2014 a março de 2016 foram selecionados para o estudo gatos atendidos no Serviço de Medicina Felina do Hospital de Clínicas Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e clínicas particulares da região metropolitana de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil, com sinais clínicos compatíveis com PIF. Foram selecionados gatos com pelo menos um dos seguintes sinais clínicos: derrames cavitários (abdominal e/ou torácica e/ou pericárdica), temperatura retal acima de 40°C, icterícia, linfadenomegalia, sinais clínicos oftálmicos e neurológicos.

Todos os animais que morreram e foram necropsiados foram utilizados como controles. Como controle positivo consideraram-se os animais que tiveram o diagnóstico conclusivo de PIF e marcação IHQ positiva nos tecidos para FCoV. No grupo controle negativo, foram incluídos os animais que não apresentaram lesões compatíveis com PIF no exame de necropsia e marcação IHQ negativa para FCoV.

Coleta das derrames cavitários e sangue total

Efusões cavitárias foram obtidas através de punção abdominal e/ou torácica com cateter tipo *scalp* n. 21 e seringa estéril. Amostras de sangue total foram obtidas através de acesso intravenoso cervical (veia jugular) em tubos EDTA de 3 ml. Os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Uso de Animais da UFRGS (CEUA), sob número 31364.

Processamento dos derrames e sangue total

As efusões foram centrifugadas a 1.500rpm durante 5 minutos para obtenção do pellet de células que foi fixado em formol tamponado 10%, processado rotineiramente para histologia e emblocados em parafina. O sangue foi centrifugado a 4.000 rpm durante 20 minutos. A capa leucocitária foi transferida para um tubo falcon. Uma solução hipotônica de fosfato dibásico foi utilizada para fazer a lise das hemácias. Para cessar a lise utilizou-se uma solução isotônica de fosfato dibásico. Centrifugou-se a 4.000 rpm durante 10 minutos até obter-se um pellet de células que foi ressuspenso em solução PBS de lavagem. Após centrifugou-se novamente a 4.000 rpm por 10 minutos, repetindo a operação até obter um pellet de células de coloração rosa claro. O pellet de células então foi incluído em solução gelatinosa de histogel (ThermoCientific), fixado em formol tamponado 10%, processado rotineiramente para histologia e emblocados em parafina.

Avaliação imunocitoquímica

Secções dos pellets de células (efusão e sangue) foram submetidos ao exame de ICQ anti-FCoV. Para o bloqueio da peroxidase endógena utilizou-se peróxido de hidrogênio diluído 10% em metanol. A recuperação antigênica foi feita em banho-maria 96°C durante 40 minutos com tampão tris-EDTA. Para o bloqueio das reações inespecíficas utilizou-se leite desnatado a 5% diluído em água destilada. O anticorpo

primário monoclonal anti-FCoV (Customom Monoclonals International) foi diluído 1:100 em PBS a 4°C, overnight. Como anticorpo secundário utilizou-se o polímero MACH-4 HRP (Biocare) conforme instruções do fabricante. O cromógeno AEC foi utilizado para revelar a reação. As lâminas foram contracoradas em hematoxilina e montadas em meio aquoso. Controles positivos foram adicionados simultaneamente às lâminas testadas e consistiram de casos positivos testados anteriormente.

Avaliação estatística

Para avaliar o valor diagnóstico da ICQ, calculou-se a sensibilidade (a proporção de resultados positivos entre todos os gatos com PIF), especificidade (a proporção de resultados negativos entre todos os gatos sem PIF), valor preditivo positivo (VPP; probabilidade de um gato com o resultado positivo do teste ter PIF) e valor preditivo negativo (VPN; a probabilidade de que um gato com um resultado do teste negativo não tenha FIP) e acurácia (a soma dos resultados do teste verdadeiramente positivos e verdadeiros negativos divididos pelo número total de resultados de teste).

Resultados

Durante o período analisado, receberam-se efusões e/ou sangue total de 35 gatos suspeitos de PIF. Dados referentes a estes animais, assim como resultados da ICQ, podem ser observados na Tabela 1.

Foram recebidas 25 amostras provenientes de efusões, sendo 19 abdominais e 6 torácicas. Destas, 16 amostras foram positivas, e 9 foram confirmadas pela necropsia. As efusões caracterizaram-se por apresentar elevada celularidade, principalmente composta por neutrófilos e macrófagos, com intensa marcação imunocitoquímica no

citoplasma de macrófagos (Figura 1).

Foram ainda recebidas 17 amostras provenientes de sangue total. Destas, 3 amostras foram positivas, sendo 2 confirmadas pelo exame de necropsia. As amostras de sangue caracterizaram por apresentar baixa celularidade, principalmente linfócitos e monócitos, com moderada marcação imunocitoquímica no citoplasma de monócitos (Figura 2).

O resumo dos resultados da ICQ com os controles (positivos e negativos) estão apresentados nas Tabelas 2 e 3. O cálculo da sensibilidade, especificidade, VPP, VPN foi de 100% para todos, e a acurácia foi de 30%.

Discussão

Tendo em vista que a infecção de monócitos e macrófagos por cepas mutantes do FCoV é considerado o evento patogênico mais importante para o desenvolvimento da PIF (Hartmann, 2005; Addie et al., 2009; Pedersen, 2014), outros autores avaliaram a marcação IFD (Hartmann et al., 2003; Paltrinieri et al., 2004; Litster et al., 2013) e ICQ (Felten, et al., 2016) do FCoV a partir de amostras de efusões de gatos suspeitos de apresentar PIF. Este trabalho teve como objetivo testar o método de ICQ anti-FCoV como método diagnóstico ante morte de PIF a partir de efusões e sangue total de gatos suspeitos de apresentar PIF

O presente trabalho apresentou uma especificidade de 100%, sendo assim, não houveram amostras falso positivas. Da mesma forma, Doenges et al., (2016), também encontrou uma especificidade de 100% para o PCR de FCoV a partir de efusões. A especificidade no diagnóstico de PIF tem especial importância, uma vez que o

prognóstico da doença é desfavorável sendo muitas vezes indicada a eutanásia (Pedersen, 2014). Entretanto trabalhos que utilizaram a técnica de ICQ (Felten, et al., 2016) e a técnica de IFD (Litster et al., 2013) encontraram uma especificidade inferior, de 72,4% e 71,4%, respectivamente. É provável que o processamento e fixação mais agressivo do presente trabalho, quando comparado com o utilizado na ICQ e IFD, tenha dificultado a detecção de quantidades mais sutis de antígenos. Essa pode ser a explicação para não haverem resultados falso positivos, uma vez que só é detecta uma quantidade expressiva de antígenos no interior dos macrófagos/monócitos, sem aparentemente interferir na sensibilidade.

Quanto a sensibilidade, outros autores que realizaram testes através de IFD (Hartmann et al., 2003), ICQ (Felten, et al., 2016) e PCR (Doenges et al., 2016) apresentaram valores que variaram entre 85 e 88,9%. Entretanto, no presente trabalho, a sensibilidade foi de 100%, assim como o observado por Litster et al., (2013), que utilizou a técnica de IFD. A alta sensibilidade observada em ambos os trabalhos pode ser explicada pela padronização na coleta e processamento imediato das amostras coletadas *ante mortem*, assim como a utilização de anticorpo monoclonal específico para FCoV felino. (Litster et al., 2013)

Certamente o grande diferencial do trabalho foi o processamento histológico da capa leucocitária do sangue total, que permitiu a marcação ICQ intracitoplasmática de monócitos circulantes no sangue. A forma efusiva da PIF representa aproximadamente 70% dos casos, sendo assim, a forma não efusiva representa cerca de 30% dos casos (Kipar, 2014). A marcação ICQ positiva de monócitos no sangue abre precedentes para o diagnóstico da doença na forma não efusiva uma vez que ainda existe uma lacuna no que diz respeito a um diagnóstico *ante mortem* e não invasivo desta forma da doença (Paltrinieri et al., 2004; Kipar, 2014). Apesar da baixa celularidade observada nas

amostras, a utilização do Histogel foi eficiente para manter a integridade do pellet de células da capa leucocitária durante todo o processamento histológico. De maneira semelhante, o Histogel já vem sendo utilizado como alternativa para o processamento de amostras pequenas e delicadas e também de pellets de células (Joiner and Spangler, 2012; Rolim et al., 2017).

Uma importante limitação neste trabalho é o tamanho do número amostral, que é relativamente pequeno, tanto é que o valor da acurácia foi baixo, de apenas 30%, além disto, segundo Litster et al., (2013), é irreal esperar que qualquer teste possa ter 100% de sensibilidade ou especificidade sob uma variedade de condições observadas na vida real. Apesar do grupo controle utilizado no presente trabalho ser considerado o mais adequado para este tipo de teste (Doenges et al, 2016), houve um baixo número de exames de necropsia realizados. Isto se deve porque muitos tutores não encaminharam ou não autorizaram a necropsia de seus gatos. Outra questão é que foram encaminhados muitos felinos com suspeita de PIF, segundo os critérios descritos nos materiais e métodos, entretanto como alguns gatos se recuperaram dos sinais clínicos e não morreram, provavelmente não eram casos de PIF. Outra limitação do trabalho é que nem todos os tipos de amostras estiveram disponíveis de todos os animais, sendo assim, a comparação entre os testes ficou prejudicada (Doenges et al, 2016).

Conclusões

A partir dos resultados obtidos é possível concluir que o teste de ICQ anti-FCoV foi sensível e específico como método diagnóstico ante mortem da PIF. A separação da capa leucocitária e marcação ICQ em monócitos circulantes no sangue abre precedentes para o aprofundamento dos estudos no diagnóstico ante mortem da PIF em sangue,

principalmente nos casos em que não há efusão cavitária.

Conflito de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

Agradecimentos

Este trabalho recebeu financiamento do Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq).

Referências

- Addie, D., Belák, S., Boucraut-Baralon, C., Egberink, H., Frymus, T., Gruffydd-Jones, T., Hartmann, K., Hosie, M.L., Lloret, A., Lutz, H., Marsilio, F., Pennisi M.G., Radford, A.D. Thiry, E., Truyen, U., Horzinek, M. 2009. Feline infectious peritonitis: ABCD guidelines on prevention and management. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 11, 594-604.
- Doenges, J.J., Weber, K., Dorsch, R., Fux, R., Hartmann, K. 2016. Comparison of real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction of peripheral blood mononuclear cells, serum and cell-free body cavity effusion for the diagnosis of feline infectious peritonitis. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 19, 344-350.
- Felten, S., Matiasek, K., Gruendl, S., Sangl, L., Wessg., Hartmann, K. 2016. Investigation into the utility of an immunocytochemical assay in body cavity effusions for diagnosis of feline infectious peritonitis. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 19, 410-418.
- Giori, L., Giordano, A., Giudice, C., Grieco, V., Paltrinieri S. 2011 Performances of different diagnostic tests for feline infectious peritonitis in challenging clinical cases. *Journal of Small Animal Practice* 52, 152–157.
- Hartmann, K. 2005. Feline Infectious Peritonitis. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice* 35, 39-79.
- Hartmann, K., Binder, C., Hirschberger, J., Cole, D., Reinacher, M., Schroo, S., Frost, J., Egberink, H., Lutz, H., Hermanns, W. 2003. Comparison of Different Tests to Diagnose Feline Infectious Peritonitis. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 17, 781–790 .

- Joiner, K.S., Spangler, E.A. 2012. Evaluation of HistoGel™-embedded specimens for use in veterinary diagnostic pathology. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 24, 710–715.
- Kipar, A. 2014. Feline Infectious Peritonitis: Still an Enigma?. *Veterinary Pathology* 51, 505-526.
- Litster, A.L., Pogranichniy, R., Lin, T.L. 2013. Diagnostic utility of a direct immunofluorescence test to detect feline coronavirus antigen in macrophages in effusive feline infectious peritonitis. *The Veterinary Journal* 198, 362–366.
- Paltrinieri, S., Giordano, A., Ceciliani, F., Sironi, G. 2004. Tissue distribution of a feline AGP related protein (fAGPrP) in cats with feline infectious peritonitis (FIP). *Journal of Feline Medicine and Surgery* 6, 99–105.
- Pedersen, N.C. 2014. An update on feline infectious peritonitis: Diagnostics and Therapeutics. *The Veterinary Journal* 201, 133-141.
- Rolim, V.M., Pavarini, S.P., Campos, F.S., Pignone, V., Faraco, C., Muccillo, M.S., Roehle, P.M., da Costa, F.V., Driemeier, D. 2017. Clinical, pathological, immunohistochemical and molecular characterization of feline chronic gingivostomatitis. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 19, 403-409.

Tabela 1 Resultados da ICQ anti-FCoV realizadas em efusões e sangue total de gatos com suspeita de PIF.

Gato	Raça	Sexo	Idade	Amostra	ICQ	Necropsia	Controles
1	SRD	F	10	E. Abd/E.	+	PIF	Controle +
2	SRD	M	1 ano	E. Abd/E.	+	PIF	Controle +
3	SRD	F	8 meses	E. Abd/E.	+	PIF	Controle +
4	SRD	M	NI	E. Abd	+	PIF	Controle +
5	Persa	M	5 meses	E. Abd	+	PIF	Controle +
6	Siamês	F	14 anos	E. Abd	+	PIF	Controle +
7	Scottish	F	2 anos	E. Abd	+	PIF	Controle +
8	SRD	M	1,5 anos	E. Abd/SgT	+	PIF	Controle +
9	SRD	F	1,5 anos	SgT	+	PIF	Controle +
10	SRD	M	1,5m	E. Abd	-	Encefalite por	Controle -
11	SRD	M	10 anos	E. Abd	-	Colangiohepatite	Controle -
12	SRD	M	1 ano	E. Tor	-	Linfoma	Controle -
13	SRD	F	20 anos	E. Tor	-	ICC	Controle -
14	SRD	F	6 anos	SgT	-	Linfoma	Controle -
15	SRD	M	9 meses	E. Abd	+	nr	
16	SRD	M	2 anos	E. Abd	+	nr	
17	SRD	F	1 ano	E. Abd	+	nr	
18	SRD	M	2 anos	E. Abd	+	nr	
19	M. Coon	M	7 meses	E. Abd	+	nr	
20	SRD	M	2 anos	SgT	+	nr	
21	SRD	M	NI	E. Abd	-	nr	
22	SRD	M	11 anos	E. Abd	-	nr	
23	SRD	F	NI	E. Abd/SgT	-	nr	
24	SRD	M	2 anos	E. Abd/SgT	-	nr	
25	SRD	M	1 ano	E. Tor/SgT	-	nr	
26	SRD	F	3 anos	SgT	-	nr	
27	M. Coon	M	11	SgT	-	nr	
28	SRD	F	8 meses	SgT	-	nr	
29	SRD	M	1,5 anos	SgT	-	nr	
30	SRD	F	3 anos	SgT	-	nr	
31	SRD	F	1 ano	SgT	-	nr	
32	Persa	M	8 anos	SgT	-	nr	
33	Persa	M	3 meses	SgT	-	nr	
34	SRD	M	4 meses	SgT	-	nr	
35	Persa	M	7 anos	SgT	-	nr	

SRD: sem raça definida; F: fêmea; M: macho; NI: não informado; E. Abd.: efusão abdominal; E. Tor.:

efusão torácica; SgT: sangue total; PIF: peritonite infecciosa felina; ICC: insuficiência cardíaca congestiva;

ICQ: imunocitoquímica; +: positivo; -: negativo; nr: não realizado.

Tabela 2 Resumo dos resultados da ICQ anti-FCoV para efusão e sangue total de gatos suspeitos de apresentar PIF.

Tipo de amostra	Nº de amostras	Positivo na ICQ	Controle Positivo	Negativo na ICQ	Controle Negativo
Efusão	25	16/25 (64%)	9/16 (56%)	9/25 (36%)	4/9 (44%)
Abdominal	19	13/19 (68%)	8/13 (62%)	6/19 (32%)	2/8 (25%)
Torácica	6	3/6 (50%)	3/3 (100%)	3/6 (50%)	2/3 (67%)
Sangue total	17	3/17(18%)	2/3 (67%)	14/17 (82%)	1/14 (7%)

ICQ: imunocitoquímica

Tabela 3 Resumo dos resultados da ICQ anti-FCoV, amostras positivas e negativas e de sensibilidade e especificidade de gatos suspeitos de apresentar PIF.

Nº de amostras	Efusão	Sangue total
Positivas	16	3
Verdadeiramente positivas	9	2
Falso positivas	0	0
Negativas	9	14
Verdadeiramente negativas	4	1
Falso Negativas	0	0
Sensibilidade	100%	100%
Especificidade	100%	100%

Legendas das figuras

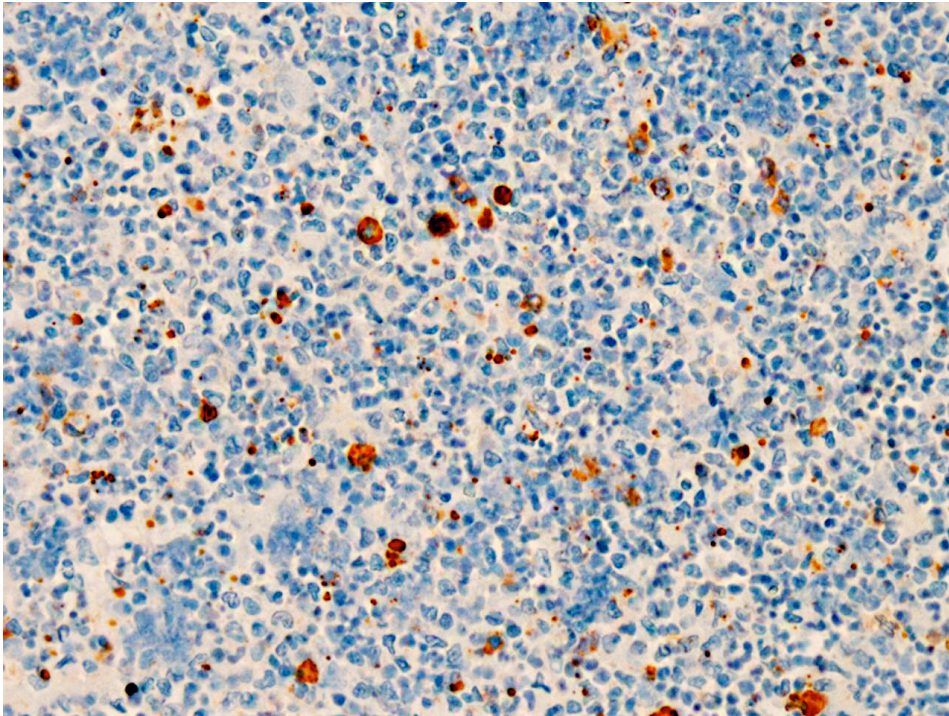


Fig.1. Felino, efusão torácica, marcação ICQ anti-FCoV positiva no citoplasma de macrófagos. ICQ anti-FCoV, contra-coloração hematoxilina, 20x.

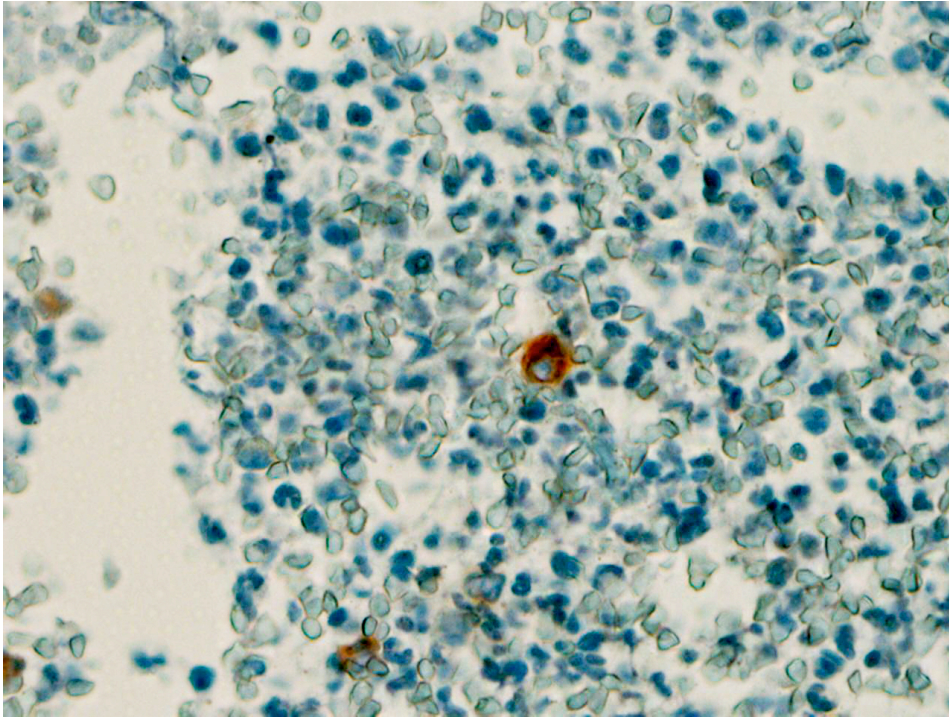


Fig. 2. Felino, sangue, marcação ICQ anti-FCoV positiva no citoplasma de monócitos. ICQ anti-FCoV, contra-coloração hematoxilina, 40x.

4. ARTIGO 3

Nesse item é apresentado o artigo intitulado “**Myocarditis caused by Feline Immunodeficiency Virus in Five Cats with Hypertrophic Cardiomyopathy**” que foi publicado na revista *Journal of Comparative Pathology*.



INFECTIOUS DISEASE

Myocarditis caused by Feline Immunodeficiency Virus in Five Cats with Hypertrophic Cardiomyopathy

V. Machado Rolim^{*}, R. Assis Casagrande[†],
 A. Terezinha Barth Wouters[‡], D. Driemeier^{*} and S. Petinatti Pavarini^{*}

^{*} Department of Veterinary Pathology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, [†] Department of Veterinary Pathology, Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages and [‡] Department of Veterinary Medicine, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Brazil

Summary

Viral infections have been implicated as the cause of cardiomyopathy in several mammalian species. This study describes hypertrophic cardiomyopathy (HCM) and myocarditis associated with feline immunodeficiency virus (FIV) infection in five cats aged between 1 and 4 years. Clinical manifestations included dyspnoea in four animals, one of which also exhibited restlessness. One animal showed only lethargy, anorexia and vomiting. Necropsy examination revealed marked cardiomegaly, marked left ventricular hypertrophy and pallor of the myocardium and epicardium in all animals. Microscopical and immunohistochemical examination showed multifocal infiltration of the myocardium with T lymphocytes and fewer macrophages, neutrophils and plasma cells. An intense immunoreaction for FIV antigen in the cytoplasm and nucleus of lymphocytes and the cytoplasm of some macrophages was observed via immunohistochemistry (IHC). IHC did not reveal the presence of antigen from feline calicivirus, coronavirus, feline leukaemia virus, feline parvovirus, *Chlamydia* spp. or *Toxoplasma gondii*. The results demonstrate the occurrence of FIV infection in inflammatory cells in the myocardium of five cats with myocarditis and HCM.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: feline immunodeficiency virus; hypertrophic cardiomyopathy; immunohistochemistry; myocarditis

Viral infections have been suggested to be a possible cause of cardiomyopathy in various mammalian species (Barbaro *et al.*, 1998; Badorff *et al.*, 1999; Meurs *et al.*, 2000; Yearley *et al.*, 2006; Sani, 2008). Human immunodeficiency virus (HIV) and simian immunodeficiency virus (SIV) have been detected in myocarditis lesions in man and apes, respectively (Barbaro *et al.*, 1998; Yearley *et al.*, 2006; Pozzan *et al.*, 2009). However, the ability of HIV to infect cardiomyocytes is surrounded by controversy, as the entry pathway of HIV into these cells has not been established, given that they do not express CD4

receptors (Barbaro *et al.*, 2001; Currie and Boon, 2003). Moreover, it is likely that other factors also play a role in the aetiopathogenesis of HIV-induced heart lesions, such as opportunistic infections, the immune response to the viral infection, cardiotoxic drugs, malnutrition and prolonged immunosuppression (Sani, 2008).

Myocardial inflammation is often observed in systemic diseases, yet rarely does it manifest as primary changes in the heart. The possible causes of this condition include infection by *Trypanosoma cruzi*, *Toxoplasma gondii*, feline parvovirus (FPV), *Bartonella henselae* and, in some cases, opportunistic fungi (Maxie and Robinson, 2007; Varanat *et al.*, 2012).

Correspondence to: V. Machado Rolim (e-mail: veronicarolim17@yahoo.com.br).

0021-9975/\$ - see front matter
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcpa.2015.10.180>

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Feline immunodeficiency virus (FIV) is a Lentivirus whose structure, replication cycle and pathogenesis are similar to those of HIV (Hosie *et al.*, 2011). Infected cats are generally presented with lesions associated with immunodeficiency such as gingivostomatitis, chronic rhinitis, lymphadenopathy, immune-mediated glomerulonephritis and dermatitis, although some animals may not exhibit any lesions (Hosie *et al.*, 2009; Hartmann, 2011). Thus far, FIV has not been associated with lesions in the cardiovascular system. This study describes myocarditis associated with FIV infection in five cats with hyper-

trophic cardiomyopathy (HCM). Virus was detected in cardiac lesions via immunohistochemistry (IHC). The myocarditis associated inflammatory infiltrate was characterized using cell markers for lymphocytes and macrophages.

The five cats were submitted for routine necropsy examination to the Department of Veterinary Pathology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), between 2010 and 2012. The cats had gross and microscopical changes consistent with HCM. Organ and tissue samples were fixed in 10% neutral buffered formalin for 24–48 h, then processed

Table 1
Primary antibodies and immunohistochemical protocols applied in the study

<i>Antibody</i>	<i>Antigen retrieval</i>	<i>Dilution</i>	<i>Detection method</i>	<i>Chromogen</i>
Monoclonal				
Mouse anti-feline immunodeficiency virus, p24 gag (AbD Serotec, Kidlington, UK)	40 min, 100°C, 0.01 M citrate buffer pH 6.0	1 in 100	LSAB-AP	PR
Mouse anti-feline calicivirus, FCV2-16 (Custom Monoclonals, Sacramento, California, USA)	20 min, 37°C, P-XIV	1 in 50	MACH 4	AEC
Mouse anti-coronavirus, FIPV3-70 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA)	20 min, 100°C, 0.01 M citrate buffer pH 6.0	1 in 300	LSAB-HRP	DAB
Mouse anti-feline leukaemia virus, gp 70 (AbD Serotec)	40 min, 100°C, Tris-EDTA buffer pH 9.0	1 in 500	LSAB-AP	PR
Mouse anti-feline/canine parvovirus (AbD Serotec)	20 min, 37°C, P-XIV	1 in 1,000	LSAB-HRP	AEC
Mouse anti- <i>Chlamydia</i> spp., ACI (Fitzgerald Industries, Acton, Massachusetts, USA)	5 min, 37°C P-K (ready to use)	1 in 100	LSAB-HRP	AEC
Mouse anti-CD79 α cy, HN57 (Dako, Carpinteria, California, USA)	20 min, 100°C, Tris-EDTA buffer pH 9.0	1 in 100	LSAB-HRP	DAB
Polyclonal				
Goat anti- <i>Toxoplasma gondii</i> (VMRD, Pullman, Washington, USA)	10 min, 37°C trypsin 0.1% and microwave (700 W), 2 min, 0.01 M citrate buffer, pH 6.0	1 in 1,000	LSAB-HRP	DAB
Rabbit anti-human lysozyme, EC 3.2.1.17 (Dako)	10 min, 37°C P-K	1 in 200	LSAB-HRP	DAB
Rabbit anti-human CD3 (Dako)	20 min, 37°C P-XIV	1 in 500	LSAB-AP	PR

P-XIV, protease XIV (Sigma); P-K, proteinase-K (Dako); LSAB-HRP, biotin-peroxidase-streptavidin (Dako); LSAB-AP, streptavidin-biotin-alkaline phosphatase (Dako); MACH 4, universal HRP-polymer (Biocare); AEC, 3-amino-9-ethyl-carbazole (Dako); DAB, 3, 3' diaminobenzidine (Dako); PR, permanent red (Dako).

Feline Immunodeficiency Virus Myocarditis

5

routinely and embedded in paraffin wax. Sections were stained with hematoxylin and eosin (HE) and sections of myocardium were also stained by Grocott's methenamine silver and modified Brown–Hopps (Gram) protocols.

Tissue sections were subjected to IHC to detect the following pathogens: FIV, feline calicivirus (FCV), feline coronavirus, feline leukaemia virus (FeLV), FPV, *Chlamydia* spp. and *T. gondii*. The inflammatory infiltrate was also characterized by IHC using markers specific for CD3 (T lymphocytes), CD79 (B lymphocytes) and lysozyme (macrophages). The IHC protocols are described in Table 1. Positive controls included previously tested samples that were assessed simultaneously with the test slides. Negative controls consisted of tissue samples incubated with phosphate buffered saline (PBS) instead of primary antibody. Anti-FIV IHC was also carried out on samples from every cat that presented with heart lesions during the period between 2010 and 2012.

During the period between 2010 and 2012 there was a total of 358 feline necropsy examinations, among which 22 cases (6.1%) exhibited heart lesions. Sixteen cats (72.7%) were diagnosed only with HCM (without myocarditis), five (22.7%) had myocarditis and HCM and one (4.5%) had dilated cardiomyopathy. The breed, sex, age, clinical signs and gross lesions observed in the five cats with myocarditis and HCM are shown in Table 2. Clinically, the majority of animals had dyspnoea (cats 1, 2, 3 and 5). One cat also exhibited restlessness (cat 2), while one only



Fig. 1. Myocarditis and hypertrophic cardiomyopathy in a cat infected with FIV. There is moderate cardiomegaly with pallor of the epicardium. Small white nodules are scattered over the epicardial surface. Bar, 3 cm.

displayed lethargy and anorexia (cat 4) and suffered from vomiting. All of the animals died spontaneously and did not receive any treatment, except for cat 5 that was treated with antibiotics because of suspected pneumonia due to dyspnoea. Among the other 17 cats with heart lesions, 15 were of mixed breed and two were Persians, 11 were male and six were female and the average age was 6.2 years. At necropsy examination, all cases had marked cardiomegaly, accentuated concentric left ventricular hypertrophy and pallor of the myocardium and epicardium (Figs. 1

Table 2
Signalment, clinical presentation and gross post-mortem findings in cats of this study

Cat number	Breed, age and sex	Clinical signs	Gross lesions (non-cardiac)	Cardiac lesions
1	Persian, 10 months, male	Dyspnoea	Lungs oedematous and heavy	Cardiomegaly, left ventricular hypertrophy, multifocal to coalescing white–tan areas in myocardium and epicardium
2	Persian, 4 years, male	Restlessness, dyspnoea	Lungs oedematous and heavy, liver enlarged and dark	Cardiomegaly, left ventricular hypertrophy, multifocal to coalescing white–tan areas in myocardium and epicardium
3	Crossbred, 3 years, female	Dyspnoea	Blue tongue and oral mucosae, moderate hydrothorax, lungs oedematous and heavy	Moderate pericardial effusion with fibrin. Irregular epicardial surface. Cardiomegaly, left ventricular hypertrophy, multifocal to coalescing white–tan areas in myocardium and epicardium
4	Crossbred, 1.5 years, male	Lethargy, anorexia, vomiting	Pale mucous membranes. Hydrothorax and ascites with fibrin. Lungs oedematous and heavy	Cardiomegaly, left ventricular hypertrophy, myocardial pallor
5	Crossbred, 1 year, male	Dyspnoea	Blue oral mucosae. Cervical and thoracic vessels engorged. Moderate hydrothorax. Lungs oedematous and heavy. Liver enlarged and dark	Cardiomegaly, left ventricular hypertrophy, myocardial pallor, thrombus in right atrium



Fig. 2. Myocarditis and hypertrophic cardiomyopathy in a cat infected with FIV. Cross-sections of different levels of the heart showing marked hypertrophy of the ventricular muscles, mainly in the left ventricle, with narrowing of the ventricular lumen. There is also myocardial pallor. Bar, 3 cm.

and 2). Cat 3 had pericardial effusion containing fibrin strands. A thrombus in the right atrium was observed in cat 5. All of the animals had red, aerated lungs, which released large volumes of red fluid when sectioned. Hepatomegaly (cats 2 and 5) and blue-tinged (cats 3 and 5) or pale (cat 4) mucosae, in addition to hydrothorax (cats 3, 4 and 5), were also noted. The abdominal aorta of all animals was examined, but there was no evidence of thrombosis in any case.

Histological examination revealed multifocal to coalescing areas of infiltration of the myocardium, consisting mainly of lymphocytes and, to a lesser extent, macrophages, neutrophils and plasma cells

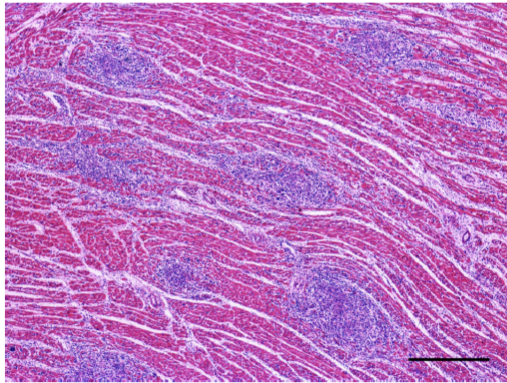


Fig. 3. Histopathological change in the heart of a cat infected with FIV and presenting with myocarditis and HCM. There is marked multifocal inflammatory infiltration. HE. Bar, 350 μ m.

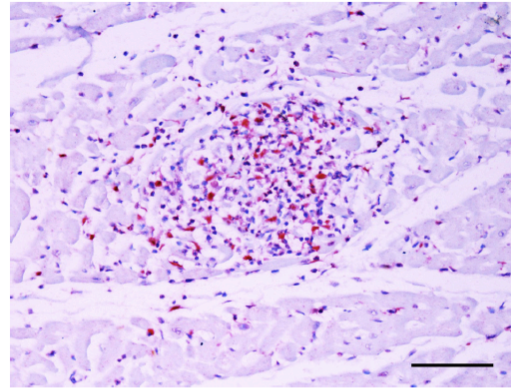


Fig. 4. Immunoreaction for FIV antigen (red colour) in the cytoplasm of lymphocytes present in the myocardium. IHC. Bar, 100 μ m.

(Fig. 3). Variable amounts of loosely-packed connective tissue were observed between cardiomyocytes. Discrete to moderate caseous necrosis was also observed associated with the infiltrates. No fungal or bacterial structures were detected by Grocott's methenamine silver and modified Brown–Hopps (Gram) stains. However, diffuse and marked congestion and alveolar oedema was observed in the lungs of all cats. In cats 2 and 5 there was diffuse hepatic congestion. No microscopical lesions were observed in other organs.

Anti-FIV IHC revealed immunoreaction in the cytoplasm and nucleus of infiltrating lymphocytes (and to a lesser extent within the cytoplasm of some macrophages) in all five cats (Fig. 4). The intensity of the immune reactivity of the samples is shown in Table 3. An anti-FIV immunoreaction was also observed in the cytoplasm and nucleus of lymphocytes in the spleen, lymph nodes, liver and bone marrow of all cats. No immunoreaction was detected for FCV, feline coronavirus, FeLV, FPV, *Chlamydia* spp. or *T. gondii*. Immunoreaction for CD3 and CD79 was

Table 3
Intensity of immunohistochemical labelling for FIV, CD3, lysozyme and CD79

Cat number	FIV	CD3	CD79	Lysozyme in macrophages	Lysozyme in neutrophils
1	++	++	–	+	++
2	+++	+++	–	+	+++
3	++	++	–	+	+
4	+	++	–	+	+++
5	+++	+++	–	++	+

–, negative; +, mild; ++, moderate; +++, marked.

observed in the cytoplasm of T and of B lymphocytes, respectively. Anti-lysozyme IHC showed immunoreaction in the cytoplasm of macrophages and neutrophils. The intensity of these immunoreactions is shown in Table 3. No immunohistochemical labelling was observed in the other 16 cases of HCM or the case of dilated cardiomyopathy.

Evidence points to a viral aetiology of myocarditis (Barbaro *et al.*, 1998; Badorff *et al.*, 1999; Meurs *et al.*, 2000; Yearley *et al.*, 2006; Sani, 2008); however, the associated cell invasion and aetiopathogenic mechanisms have not been clarified (Barbaro *et al.*, 1998, 2001; Currie and Boon, 2003; Yearley *et al.*, 2006; Pozzan *et al.*, 2009). The present study has shown the presence of FIV antigens in myocarditis lesions in cats. Previous studies have detected two other lentiviruses, HIV and SIV, in human and simian hearts with myocarditis, respectively (Barbaro *et al.*, 1998; Yearley *et al.*, 2006; Pozzan *et al.*, 2009). FIV has also been associated with myopathy in adult cats (Podell *et al.*, 1998) and HIV and SIV are similarly implicated in myopathy in man and simians, respectively (Dalakas *et al.*, 1987; Chan *et al.*, 2007).

In a study conducted in HIV patients, polymerase chain reaction (PCR) allowed the detection of HIV nucleic acid sequences in the heart tissue of 76% of patients with cardiomyopathy and in 57% of patients with myocarditis, suggesting that HIV acts directly in the myocardium, inducing myocarditis and dilated cardiomyopathy (Barbaro *et al.*, 1998). However, a positive immunoreaction was observed in the dendritic and interstitial cells in only one case of myocarditis of undetermined cause (Pozzan *et al.*, 2009). The comparatively higher rate of identification achieved using PCR may be related to the greater sensitivity of this technique. Here, the performance of IHC was satisfactory in that it afforded a good degree of sensitivity, with positive immunoreaction being observed in all cats with myocarditis.

FIV is considered to be endemic throughout the world. The virus is most commonly detected in adult male cats that are exposed to contact with other cats or that live in shelters, because the main route of infection is via biting (Hosie *et al.*, 2009). In the present study, most of the sick animals that were examined (four out of five) were males; however, no information regarding the management of these cats or how frequently they were given access to the street was obtained.

The mean age of the cats in this study was 2.5 years, which is younger than the mean age of 4–6 years reported for FIV-positive cats presenting with clinical signs of immunodeficiency (Hosie *et al.*, 2009). Never-

theless, the clinical signs and lesions observed in this study are not listed in classical descriptions of feline immunodeficiency (Hosie *et al.*, 2009; Hartmann, 2011); instead, these signs and lesions are associated with different types of direct effects of FIV or inflammatory cells on the heart.

The heart lesions in these cats were classified as HCM due to the gross appearance of marked concentric hypertrophy, mainly in the left ventricle, with narrowing of the ventricular lumen. In a retrospective study on idiopathic feline cardiomyopathy, HCM was considered to be the main form of the condition, accounting for 57.5% of cases (Ferasin *et al.*, 2003). Viral myocarditis may induce secondary cardiomyopathy, leading to heart failure, possibly due to morphological changes in the cytoskeleton (Meurs *et al.*, 2000).

HCM is the most common cause of heart disease in cats (Maxie and Robinson, 2007), as observed in the present study (68.1%). However, the presence of FIV was only observed in cases associated with myocarditis, as none of the other hearts with cardiac lesions were positive for FIV antigen by IHC.

In this study, the inflammatory infiltrate involved T lymphocytes and macrophages. In a study of apes with myocarditis, IHC also revealed T lymphocytes and macrophages infiltrating the heart lesions. Similar to HIV and SIV, FIV infects helper T lymphocytes and macrophages in heart lesions. These cells play an important immunological role, assisting in both humoral and cell-mediated immunity (Hosie *et al.*, 2009).

The present study identified FIV antigen in inflammatory cells in the hearts of cats with myocarditis and HCM. However, the specific relationship between FIV and myocarditis was not established. Further studies are required to explore the relationship between FIV, myocarditis and HCM in cats.

Acknowledgments

This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

References

- Badorff C, Lee G, Lamphear BJ, Martone ME, Campbell KP (1999) Enteroviral protease 2A cleaves dystrophin: evidence of cytoskeletal disruption in an acquired cardiomyopathy. *Nature*, **5**, 320–326.
- Barbaro G, di Lorenzo G, Grisorio B, Barbarini G (1998) Incidence of dilated cardiomyopathy and detection of HIV in myocardial cells of HIV-positive patients. *New England Journal of Medicine*, **339**, 1093–1099.

- Barbaro G, Fisher SD, Lipshultz SE (2001) Pathogenesis of HIV-associated cardiovascular complications. *Lancet Infectious Diseases*, **1**, 115–124.
- Chan AT, Kirton C, Estanislao L, Simpson DM (2007) Myopathy in HIV infection. In: *Handbook of Clinical Neurology*, 3rd Edit., P Portegies, JR Berger, Eds., Elsevier Saunders, Philadelphia, pp. 139–145.
- Currie PF, Boon NA (2003) Immunopathogenesis of HIV-related heart muscle disease: current perspectives. *AIDS*, **17**, 21–28.
- Dalakas MC, Gravell M, London WT, Cunningham G, Sever JL (1987) Morphological changes of an inflammatory myopathy in rhesus monkeys with simian acquired immunodeficiency syndrome. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, **185**, 368–376.
- Ferasin L, Sturgess CP, Cannon MJ, Caney SMA, Gruffydd-Jones TJ *et al.* (2003) Feline idiopathic cardiomyopathy: a retrospective study of 106 cats (1994–2001). *Journal of Feline Medicine and Surgery*, **5**, 151–159.
- Hartmann K (2011) Clinical aspects of feline immunodeficiency and feline leukemia virus infection. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **143**, 190–201.
- Hosie MJ, Addie D, B elak S, Boucraut-Baralon C, Egbering H *et al.* (2009) Feline immunodeficiency ABCD guidelines on prevention and management. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, **11**, 575–584.
- Maxie MG, Robinson WF (2007) Cardiovascular system. In: *Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of Domestic Animals*, 3rd Edit., MG Maxie, Ed., Elsevier Saunders, Philadelphia, pp. 1–106.
- Meurs KM, Fox PR, Magnon AL, Liu SK, Towbin JA (2000) Molecular screening by polymerase chain reaction detects panleukopenia virus DNA in formalin-fixed hearts from cats with idiopathic cardiomyopathy and myocarditis. *Cardiovascular Pathology*, **9**, 119–126.
- Podell M, Chen E, Shelton GD (1998) Feline immunodeficiency virus associated myopathy in the adult cat. *Muscle and Nerve*, **21**, 1680–1685.
- Pozzan G, Pagliari C, Tuon FF, Takanura CF, Kaufmann MR *et al.* (2009) Diffuse-regressive alterations and apoptosis of myocytes: possible causes of myocardial dysfunction in HIV-related cardiomyopathy. *International Journal of Cardiology*, **132**, 90–95.
- Sani MU (2008) Myocardial disease in human immunodeficiency virus (HIV) infection: a review. *Wiener Klinische Wochenschrift*, **4**, 77–87.
- Varanat M, Broadhurst J, Linder KE, Maggi RG, Breitschwerdt EB (2012) Identification of *Bartonella henselae* in 2 cats with pyogranulomatous myocarditis and diaphragmatic myositis. *Veterinary Pathology*, **49**, 608–611.
- Yearley JH, Pearson C, Carville A, Shannon RP, Mansfield KG (2006) SIV-associated myocarditis: viral and cellular correlates of inflammation severity. *AIDS Research and Human Retroviruses*, **22**, 529–540.

[Received, September 3rd, 2015]
 [Accepted, October 14th, 2015]

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho apresentou as principais causas de morte em gatos na região sul do Brasil. Através deste trabalho, ficou demonstrada a importância das doenças infecciosas/parasitárias como causa de morte, sendo considerada a segunda categoria mais prevalente do estudo. Neste mesmo trabalho ainda ficou evidente a importância da PIF como a terceira causa de morte e a principal doença infecciosa em gatos. Tendo em vista a importância das doenças infecciosas em gatos observada no primeiro trabalho, nos próximos artigos foram abordados dois importantes agentes infecciosos de gatos, o FCoV e o FIV.

No segundo artigo foi possível diagnosticar a presença dos antígenos do FCoV no interior de macrófagos e monócitos de gatos suspeitos de apresentar PIF. A técnica apresentou satisfatória sensibilidade e especificidade e abre perspectivas para o diagnóstico *ante mortem* tanto da PIF efusiva como da forma não efusiva.

O terceiro trabalho realizou a tríade diagnóstica, através da caracterização anatomopatológica (macro e microscópica) da cardiomiopatia hipertrófica e miocardite com a identificação IHQ dos antígenos virais do FIV na lesão cardíaca.

Os resultados obtidos neste estudo orienta veterinários e tutores sobre as principais causas de morte em gatos, descreve uma nova técnica para o diagnóstico *ante mortem* da PIF e ainda relaciona o FIV a miocardite e cardiomiopatia hipertrófica em gatos.

6. REFERÊNCIAS

DRISCOLL,C.A.; MENOTTI-RAYMOND, M.; ROCA, A.L. HUPE K. JOHNSON,W.E. The Near Eastern Origin of Cat Domestication. **Science**. v.317, p.519-523, 2007.

MURRAY, J.K.; SKILLINGS E.; GRUFFYDD-JONES, T.J. A study of risk factors for cat mortality in adoption centres of a UK cat charity. **J J. Feline Med. Surg.** v.10, p. 338-345, 2008.

O'NEILL, D.G.; CHURCH, D.B.; MCGREEVY, P.D.; THOMSON P.C.; BRODBELT, D.C. Longevity and mortality of cats attending primary care veterinary practices in England. **J. Feline Med. Surg.** v.17, n.2, p 125-133.