

# Detecção do vírus da imunodeficiência felina em gatos domésticos (*Felis catus*) pela técnica de reação em cadeia da polimerase\*

## Detection of feline immunodeficiency virus in domestic cats (*Felis catus*) by polymerase chain reaction technique

Camila de Cassia dos Santos,\*\* Kely Feitosa Valente,\*\* Caio Cezar Nogueira de Souza,\*\* Pedro Henrique Marques Barrozo,\*\* Jacqueline da Silva Brito,\*\* Marceley Karen Santos do Rosário,\*\* Caroliny do Socorro Brito Santos,\*\* Alzira Alcantara Mendes Queiroz Neta,\*\* Fernanda Monik Silva Martins,\*\* Andrea Viana da Cruz,\*\*\* Alexandre do Rosário Casseb\*\*\*\*

### Resumo

O objetivo deste trabalho foi detectar a presença de DNA do Vírus da Imunodeficiência Felina (FIV) em gatos domésticos (*Felis catus*) assintomáticos. Foi realizada a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) em 50 animais. Para tal, foram coletadas amostras de sangue, por venopunção da jugular, de forma asséptica para armazenamento de 1-2 mL de sangue total. Os animais que participaram do estudo fizeram parte do projeto de castração “Vida digna” da Universidade Federal Rural da Amazônia. E a escolha dos animais foi realizada de maneira aleatória, sem distinção por sexo ou idade, resultando em 29 fêmeas e 21 machos. Para o diagnóstico, foi realizada a extração do DNA, em seguida as amostras foram testadas em duas reações de PCR utilizando-se dois conjuntos de primers do Gene gag de FIV. Achou-se uma prevalência de 2% (1/50), confirmando assim a presença do vírus na cidade de Belém. Assim, evidenciando a importância de testar os felinos mesmo sendo assintomáticos. Desta forma, faz-se necessário a realização de trabalhos futuros que amplie o número amostral dos animais testados para assim elucidar o perfil epidemiológico da doença na região de Belém do Pará, considerando a relevância clínica desta infecção e a correta conduta médica veterinária para evitar novas infecções.

**Palavras-chave:** diagnóstico molecular, perfil epidemiológico, retrovírose, saúde animal.

### Abstract

The objective of this work was to detect the presence of Feline Immunodeficiency Virus (FIV) proviral DNA in asymptomatic domestic cats (*Felis catus*). The polymerase chain reaction technique was performed from 50 animals. For this, blood samples were collected by jugular venipuncture, aseptically for storage of 1-2 mL of whole blood. The animals that participated in the study were part of the castration project “Vida digna” at the Universidade Federal Rural da Amazônia. And the choice of animals was performed randomly, without distinction by sex or age, resulting in 29 females and 21 males. For diagnosis, DNA extraction was performed, then the samples were tested in two PCR reactions using two sets of FIV gag gene primers. A prevalence of 2% (1/50) was observed, thus confirming the presence of the virus in the city of Belém. Thus, highlighting the importance of testing the felines even if they are asymptomatic. Therefore, it is necessary to carry out future work that expands the sample number of animals tested in order to elucidate the epidemiological profile of the disease in the region of Belém do Pará, considering the clinical relevance of this infection and the correct veterinary medical conduct to avoid new infections.

**Keywords:** animal health, epidemiological profile, molecular diagnosis, retrovirus.

### Introdução

Com aumento da população de animais domésticos, surgiu a necessidade de atendimentos veterinários especializados que auxiliam de forma direta na qualidade de vida dos pets (XAVIER, 2012). Dessa forma, cabe ao Médico Veterinário ter conhecimento do comportamento biológico dos seus pacientes, para estabelecer o diagnóstico das doenças e procurar maneiras de preveni-las (FISCHER e PETRUCCI, 2005).

Uma dessas particularidades em doença é o vírus da imunodeficiência felina, cujo é uma retrovírose que atinge o sistema imunológico do animal, essa retrovírose se mantém durante toda a vida do animal, na maior parte das vezes de maneira assintomática, manifestando-se durante a queda de imunidade (LEAL e VILLANOVA, 2015) e por ainda não possuir vacina e tratamento curativo, possui grande relevância na clínica de pequenos animais.

\*Recebido em 16 de março de 2022 e aceito em 23 de maio de 2022.

\*\*Universidade Federal Rural da Amazônia, Instituto de Saúde e Produção Animal, Departamento de Biologia Molecular, Belém, Pará, Brasil.

\*\*\*Universidade Federal do Pará, Instituto de Medicina Veterinária, Castanhal, Pará, Brasil. E-mail: andrea.vianacruz@gmail.com.

\*\*\*\*Docente, Instituto de Saúde e Produção Animal, Departamento de Biologia Molecular, Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, Pará, Brasil.

Na região Norte, especificamente na cidade de Belém do Pará é escasso o registro desta enfermidade, principalmente por falta da confirmação laboratorial. As análises laboratoriais são um grande aliado na clínica, sendo essenciais para chegar a um diagnóstico definitivo, responsável por auxiliar em 70% das decisões médicas (BRAZ e GARCIA, 2017).

O FIV é classificado em cinco subtipos: A, B, C, D e E, os quais ocorrem em três principais fases: aguda, crônica e terminal (SCHMITT, 2003). A transmissão do vírus dá-se principalmente por mordidas, neste caso, animais de rua, de abrigos, não castrados e em locais de alta densidade, são mais propensos a contrair esta enfermidade.

Existem diferentes análises para a detecção do FIV como imunoenaios enzimáticos (ELISA) tradicionais, kits rápidos de ELISA (testes rápidos), imunofluorescência indireta (IFI), reação em cadeia mediada pela polimerase (PCR) e isolamento viral, porém dependendo do estágio da doença, há a possibilidade de falsos negativos, por isso é importância conhecer o percurso da doença (ADAM e DANDRIEUX, 2011).

As retrovíroses possuem a enzima transcriptase reversa e algumas enzimas transportadoras as quais produzem uma cópia de DNA a partir de um filamento duplo do RNA do vírus. Esta cópia de DNA, denominada pró-vírus, integra-se ao DNA cromossômico da célula do hospedeiro capacitando o vírus de replicar-se junto com a célula infectada. (BARR e PHILLIPS, 2008).

O PCR é uma das técnicas que demonstram bons resultados para detecção do DNA proviral para o diagnóstico do FIV, pois independente da fase clínica, ele detectará a infecção, evitando assim falsos negativos e ajudando no controle epidemiológico dessa doença.

## Material e métodos

Foram coletadas 50 amostras de sangue de gatos domésticos (*Felis catus*), oriundos do projeto de castração Vida Digna da Ufra, que estavam clinicamente saudáveis para serem submetidos ao procedimento de castração e cada amostra foi analisada em duplicata. Destes 29 eram fêmeas e 21 machos. Os animais foram escolhidos aleatoriamente, sendo de qualquer idade, raça ou sexo. As amostras foram coletadas para uma pesquisa anterior aprovada pelo Comitê de Ética da UFRA com protocolo nº 048/2017, no período de novembro a dezembro de 2017.

As amostras de sangue foram coletadas por venopunção da jugular, de forma asséptica para armazenamento de 1-2 mL de sangue total em tubo estéril contendo anticoagulante EDTA (Ácido Etilenodiamino Tetra- Acético) para imediata realização do hemograma e posteriormente armazenada em ultra freezer -80°C até o momento da análise molecular.

A extração de DNA foi realizada por meio de um kit comercial (Pure Link® Genomic DNA Mini Kit) de acordo com as recomendações do fabricante. O DNA foi eluído em 50µl de tampão de eluição que acompanha o kit e foi armazenado no ultra freezer -80°C.

O DNA total extraído do sangue foi submetido à nested-PCR para investigar a presença de DNA viral. As reações de PCR foram realizadas utilizando dois conjuntos de primers correspondentes às posições 917 e 1628 (primers FIV PCR S 2 e FIV PCR A 2) e 1036-1364 (primers FIV NESTED S e FIV NESTED A) da região P17-P24 do Gene gag de FIV (HOHDATSU et al., 1998).

Os primers externos (FIV PCR S 2 e FIV PCR A2) usados na primeira reação foram: frente, 5 'AAT ATG ACT GTA TCT ACT GC 3', e reverso, 5 'TTT TCT TCT AGA GTA CTT TCT GG 3'. Os primers internos (FIV NESTED S e FIV NESTED A).

Na segunda reação foram: frente, 5 'TAT TCA AAC AGT AAA TGG AG 3', e reverso, 5 'CTG GTT GTT CTT GAG TT 3'. A primeira reação de PCR amplifica um fragmento de DNA de 658 pb e a segunda reação resulta em um amplicon de 329 pb. Os primers foram escolhidos após a comparação cuidadosa de pelo menos 10 sequências dos diferentes subtipos de FIV publicados no GenBank (números de acesso ao GenBank: FIV-A [M25381, D37820, M36968], FIV-B [M59418, D37821], FIV-C [AY369384], U02397], FIV-D [D37818, D37822] e FIV-E [AJ304961], utilizando o software MEGA v.3.1 para Windows (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) como previamente descrito (KUMAR et al., 2004).

As reações foram realizadas em um volume total de 25µl. A primeira reação com: 12,8 µl de água purificada; 2,5 µl de bf; 2,0 µl DNTP; 1,5 µl Cl2Mg; 1,5 µl de cada iniciador; 0,2 de Taq DNA polimerase (Invitrogen®) e 3,0 µl do DNA molde. Na segunda reação: 17,05 µl de água purificada; 2,5 µl de bf; 1,0 DNTP; 0,75 µl MgCl2; 1,0 µl de cada iniciador; 0,2 µl de Taq DNA polimerase (Invitrogen®) e 1,5 µl do DNA molde.

As reações de amplificações foram realizadas em um termociclador programável (Biosystems). Os ciclos padronizados para amplificação do DNA foram realizados com base nos descritos por Hohdatsu et al. (1992): uma incubação inicial a 94°C por 5 minutos, seguida de 30 ciclos, cada uma consistindo de desnaturação a 94°C por 60 segundos, hibridização a 55°C por 60 segundos e extensão pela polimerase a 72°C por 120 segundos. Após 30 ciclos ocorreu a extensão final a 72°C por 5 minutos finalizando a 25°C ∞. Como controle positivo foi utilizado em cada uma das reações uma amostra previamente identificada como positiva para FIV específico e como controle negativo foi utilizado água bidestilada estéril.

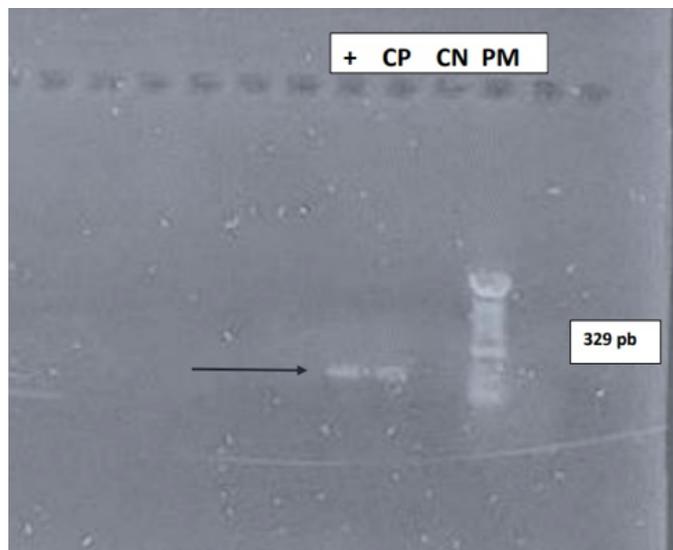
O produto resultante da PCR foi adicionado e analisado em gel de agarose a 1,5%, corado em Sybr safe e submetido à eletroforese a 100V durante com tampão TAE a 30 minutos. Depois foi realizada a leitura em um transluminador de luz ultravioleta. O tamanho do fragmento amplificado (329bp) foi estimado comparando-se com os marcadores de peso molecular 100pb e/ou 1Kb (DNA ladder Invitrogen®).

## Resultados e discussão

Dentre as amostras analisadas apenas em uma foi amplificado o provirus. Na figura 1 pode-se observar o resultado da segunda amplificação para o gene gag do FIV, com banda na altura de 329 pb da PCR.

Este índice (figura 1) está em concordância com valores encontrados por Bisol (2016) que obteve 3,38% positivos para FIV de um total de 177 animais analisados (Hospital Veterinário do Rio Grande do Sul) pela amplificação de DNA próviral mediado pela polimerase e um estudo realizado por Texeira et al., (2019) com 148 amostras de gatos em diferentes localidades de Sobral-Ceará, onde apenas 6,1% foram positivas, entretanto, a frequência do vírus do FIV é bastante variável em regiões e condições nas quais o animal possa estar mais predisposto a contaminar-se (HARTMANN, 2015).

**Figura 1:** Foto em gel de agarose a 1,5% sob luz ultravioleta mostrando os resultados das amplificações do gene gag do FIV em amostras de sangue de felinos.



Fonte: Arquivo pessoal

Comparando este resultado a outros estudos, como de Campbell et al., (2020) que ao analisar 66 amostra, no município de Mineiro, Goiás, Brasil, observou que os resultados encontrados pela técnica de PCR, representou 7,58% dos animais positivos para FIV. E um estudo realizado por Silva et al., (2014) no Rio Grande do Sul de 70 amostras de animais suspeitos obteve-se 15,7% foram positivos, afirmando assim, a maior prevalência em felinos positivos com sinais clínicos associados à FIV. As taxas da infecção pelo FIV entre os gatos domésticos variam entre 2,5% a 12,5% para FIV, de acordo com as diferentes regiões, idade, sexo e risco de exposição (RAVI et al., 2010; POFFO et al., 2017). A taxa de infecção é mais expressiva entre os gatos que apresentam sinais clínicos, comparada com a dos felinos assintomáticos (SILVA et al., 2014).

Em afirmação a essa linha de raciocínio, um estudo realizado por Silva et al., (2014), analisaram-se 70 animais para detecção de DNA proviral pela técnica de PCR nested. Desta amostra, onze dos animais doentes apresentaram-se positivos para o vírus, contra um de animais assintomáticos.

Quanto ao sexo, segundo Texeira et al., (2019) é um fator de risco significativo para infecção por FIV e o melhor fator preditivo para o status de FIV, o que pode ser explicado pelo provável comportamento agressivo visto que o FIV é transmitido primariamente por inoculação parenteral de vírus existente na saliva ou no sangue (HARTMANN, 2015). Felinos machos, de acordo com Fernandes (2015), têm um risco de contágio 2,8 vezes maior que fêmeas nas mesmas situações. Em relação

## Referência

ADAM, F.; DANDRIEUX, J. Diagnostic testing for detection of feline retroviruses. In *Practice*, 33(10), 498–506, 2011.

ARJONA, A.; BARQUERO, N.; DOME'NECHE, A.; TEJERIZO, G.; COLLADO, V.M.; TOURAL, C.; MARTIN, D.; GOMEZ-LUCIA E. Evaluation of a novel nested PCR for the routine diagnosis of feline

leukemia virus (FeLV) and feline immunodeficiency virus (FIV) related to older animals due to the disease being of slow course, with a chronic (asymptomatic) phase of variable duration, with late clinical manifestations and which can persist for years without causing the death of the animal (HARTMANN et al., 2012). However, the result of this work is contrasted with these studies, since the only positive animal was a female with less than two years of age. This result could also be explained due to the number of samples being higher for females than for males (29/21).

Various factors can influence the results of these studies, such as location, clinical phase of the disease, choice of test used, procedure of the animals. Our samples analyzed were of animals previously selected for castration (Projeto Vida digna) and were clinically healthy for the subsequent blood collection and this was also one of the reasons for the choice of detection of the proviral DNA, since at the beginning of the infection, before the appearance of the first nonspecific signs and seroconversion, a test based on indirect detection can be negative. The sensitivity and specificity of a PCR test can be improved when using a nested PCR, or in other words, the first amplification is performed using an external pair of oligonucleotides, followed by a second amplification using an internal pair of oligonucleotides (ARJONA et al.; 2007) and this form has gains in terms of specificity and in the quantity of the amplified material (LEAL e RAVAZZOLO, 1998).

A PCR for diagnosis of FIV has a great emphasis in veterinary medicine, since serological tests can not detect antibodies, since there is a period called immunological window that covers the beginning of the infection until the presence of circulating antibodies and the terminal phase in which depletion occurs in antibody levels. In addition, it is possible to occur false-positives in kittens where the mothers are positive for the virus. These cases where the animal can be negative in serological tests, PCR can detect proviral DNA (DECARO et al. 2012).

## Conclusão

Despite a low prevalence found in the group of animals tested, since these are asymptomatic, it allows affirming that FIV circulates in the population of domestic felids in the region of the city of Belém, in this way demonstrating the importance of testing felids even if they are asymptomatic. It is necessary to carry out future works that expand the number of samples, compare diagnostic methods, analyze clinical signs, procedure and style of life of the animals tested for as well as elucidate the epidemiological profile of the disease in the region of Belém do Pará, taking into account the clinical relevance of this infection and the correct medical veterinary conduct to avoid new infections.

leukemia virus (FeLV) and feline immunodeficiency virus (FIV). *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 9(1), 14-22, 2007.

BARR, M.C.; PHILLIPS, T.R. FIV e Doença Relacionada. In: ETTINGER, S.J e FELDMAN, EC. *Tratado de medicina interna veterinária*. Atlas, 2008.

- BISOL, J. Avaliação da concordância dos resultados da técnica de PCR e da técnica de imunodifusão rápida para o diagnóstico do vírus da imunodeficiência felina (FIV) e da leucemia felina (FeLV) em amostras de sangue de gatos atendidos no Setor de Medicina Felina do HCV/ UFRGS. 2016.
- BRAZ, P.H.; GARCIA, E.R. Frequência de erros pré-analíticos ocorridos na Medicina Veterinária. PUBVET, 12(2),150, 2017.
- CAMPBELL, L.M.; LEMOS, M.; DUTRA, V.; CANDIDO, S.L.; BORGES, KIN, RAMOS, DGS & BRAGA, IA. Comparison between immune chromatographic tests and polymerase chain reaction for FIV and FeLV diagnosis. Research, Society and Development, 9(7):1-15,e205974039, 2020.
- DECARO, N.; CARMICHAEL, L. E.; BUONAVOGLIA, C. Viral Reproductive Pathogens of Dogs and Cats. Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice, v. 42, n. 3, p.583-598, 2012.
- FERNANDES, A.P. R. P. Prevalência do Vírus da Imunodeficiência Felina (FIV) e do Vírus da Leucemia Felina (FeLV) e fatores de risco associados à seropositividade em gatos domésticos do distrito de Lisboa. 82 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Medicina Veterinária, Universidade de Trás-os- montes e Alto Douro, Lisboa. 2015.
- HARTMANN, K.. Clinical Aspects of Feline Retroviruses: A Review. Viruses, 4(12), 2684-2710, 2012.
- HARTMANN, K. Efficacy of antiviral chemotherapy for retrovirus-infected cats. Journal of Feline Medicine and Surgery 17(11), 925-939, 2015.
- HOHDATSU, T.; YAMADA, M.; OKADA, M.; HOHDATSU, T.; YAMADA, M.; OKDADA, M.; FUKASAWA, M.; WATANABE, K.; OGASAWARA, T.; TAKAGI, M.; AIZAWA, C.; HAYAMI, M.; KOYAMA, H. Detection of feline immunodeficiency proviral DNA in peripheral blood lymphocytes by the polymerase chain reaction. Veterinary Microbiology, 30(2-3) , 113-123, 1992.
- HOHDATSU, T.; MOTOKAWA, K.; USAMI, M. et al. Genetic subtyping and epidemiological study of feline immunodeficiency virus by nested polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of the gag gene. J. Virol. Meth., v.70, p.107-111, 1998.
- KUMAR, S.; TAMURA, K.; NEI, M.. MEGA3: software integrado para análise de genética molecular evolutiva e alinhamento de seqüências. Breve Bioinform. 5(2), 150-163, 2004.
- LEAL, E. S, VILLANOVA, F. Retrovírus. In: JERICÓ, Marques M. et al. Tratado de medicina interna de cães e gatos. Atlas. 2015.
- LEAL E. & RAVAZZOLO A.P. Detecção do vírus da imunodeficiência felina (FIV) em felídeos selvagens pertencentes à região neotropical, através da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR). Hora Vet., Porto Alegre, 101:57-60, 1998.
- POFFO, D. et al. Feline immunodeficiency virus (FIV), feline leukaemia virus (FeLV) and Leishmania sp. in domestic cats in the Midwest of Brazil. Pesquisa Veterinária Brasileira, v. 37, n. 5, p. 491-494, mai. 2017.
- RAVI, M., WOBESER, G. A., TAYLOR, S. M., JACKSON, M. L. Naturally acquired feline immunodeficiency virus (FIV) infection in cats from western Canada: Prevalence, disease associations, and s survival analysis. The Canadian Veterinary Journal, 51(3), 271, 2010.
- SILVA, F. S., CASTRO, C. C., FINGER, P. F., SILVA, D. S., TANIWAKI, S. A., ULLMANN, L. S., & HÜBNER, S. O. Ocorrência do subtipo B do vírus da imunodeficiência felina em gatos domésticos da região sul do estado do Rio Grande do Sul, Brasil. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v. 66, p. 1-6, 2014.
- SCHMITT A.C., Reischak D., Cavlac C.L., Monforte C.H.L., Couto F.T., Almeida A.B.P.F., Santos D.G.G., Souza L., Alves C., Vecchi K.. Infecção pelo vírus da leucemia e da peritonite infecciosa felina em felídeos selvagens de vida livre e de cativeiro da região do pantanal mato-grossense. Acta S. Vet. 31(3), 185-188, 2003.
- TEIXEIRA, B. M., TANIWAKI, S. A., MENEZES, P. M. M., RODRIGUES, A. K. P. P., MOUTA, A. N., ARCEBISPO, T. L. M., ... & HOSIE, M. J. Feline immunodeficiency virus in Northern Ceará, Brazil. Journal of Feline Medicine and Surgery Open Reports, 5(2), 2055116919859112. 2019.
- XAVIER, D.G. Casuística clínica e cirúrgica de uma clínica veterinária na cidade de camaquã/RS, durante o período de 2008 a 2011. 2012. Dissertação de Tese (Monografia). Universidade Rural do Semiárido – UFERSA. 19p. 2012.