

ALINE AUGUSTI

MÉTODOS DIAGNÓSTICOS PARA A DETECÇÃO
DA LEUCEMIA VIRAL FELINA

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação apresentado
à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
“Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, SP,
para obtenção do grau de médico veterinário

Preceptora: Professora Assistente Doutora Regina Kiomi Takahira

Botucatu

2009

ALINE AUGUSTI

MÉTODOS DIAGNÓSTICOS PARA A DETECÇÃO DA LEUCEMIA VIRAL FELINA

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação apresentado
à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
“Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, SP,
para obtenção do grau de médico veterinário

Área de concentração: Clínica de Pequenos Animais

Preceptora: Professora Assistente Doutora Regina Kiomi Takahira
Coordenador de Estágio: Professor Assistente Doutor Francisco José Teixeira Neto

Botucatu

2009

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação

Divisão Técnica de Biblioteca e Documentação - Campus De Botucatu - UNESP

Bibliotecária responsável: *Sulamita Selma Clemente Colnago – CRB 8/4716*

Augusti, Aline.

Métodos diagnósticos para detecção da Leucemia viral felina / Aline Augusti. – 2009.

Monografia (bacharelado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2009

1. Gato – Doenças - Diagnóstico.

Palavras-chave: Felv; Clínica; ELISA; Imunofluorescência; PCR

AUGUSTI, ALINE. Métodos diagnósticos para detecção da Leucemia viral felina. Botucatu, 2009. 20p. Trabalho de conclusão de curso de graduação (Medicina Veterinária, Área de Concentração: Clínica de Pequenos Animais) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

Resumo

O vírus da leucemia felina (FeLV) foi descrito em 1964 por William Jarrett e colaboradores ao encontrarem partículas virais ligadas à membrana de linfoblastos em gato com linfoma. O vírus pertence à família *Retroviridae*, sub-família *Oncornavirus*. Com distribuição mundial, o FeLV apresenta ocorrência de 1,6% nos felinos sadios e 10,8% em felinos doentes no Brasil. A mortalidade de animais persistentemente virêmicos em gatis é aproximadamente 50% em dois anos e 80% em três anos. Em gatis que apresentam endemiapor Coronavírus felino (FCoV), FeLV e/ou Vírus da Imunodeficiência felina (FIV), a infecção por FeLV tem maior contribuição na mortalidade. O teste para infecção do FeLV e a segregação de gatos positivos, é a principal forma de prevenir a disseminação da infecção. Os métodos diagnósticos baseiam-se nos sinais e alterações clínicas compatíveis com a infecção pelo FeLV observados por exame físico, hemograma completo, raio-x, aspirado de medula óssea e bioquímicos. A de proteína viral p27 é produzida nas células infectadas em alta quantidade e é encontrada em abundância no citoplasma e nos fluidos corporais possibilitando o diagnóstico por métodos como “Enzyme-linked immunosorbent assay” - ELISA e Imunofluorescência direta; detecção de genoma viral (Reação em cadeia da polimerase - PCR) e detecção do vírus através do isolamento viral. Embora os testes diagnósticos sejam de alta sensibilidade, deve-se realizar mais de um teste para confirmação, principalmente os sorológicos, devido a característica variável do progresso da infecção.

AUGUSTI, ALINE. Métodos diagnósticos para detecção da Leucemia viral felina. Botucatu, 2009. 20p. Trabalho de conclusão de curso de graduação (Medicina Veterinária, Área de Concentração: Clínica de Pequenos Animais) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

Abstract

The feline leukemia virus (FeLV) was described in 1964 by William Jarrett and collaborators when they found viral particles attached to the membrane of lymphoblasts in a cat with lymphoma. The virus belongs to the family Retroviridae, subfamily Oncovirinae. With worldwide distribution, the occurrence of FeLV is 1.6% in healthy cats and 10.8% in sick cats in Brazil. The mortality of persistently viremic animals in catteries is about 50% in two years and 80% in three years. In catteries that have endemic feline Coronavirus (FCoV), FeLV and / or Feline Immunodeficiency Virus (FIV), the FeLV infection has greater contribution to mortality. The test for infection and FeLV positive cats segregation is the main way to prevent the spread of infection. The diagnostic methods are based on clinical signs and changes compatible with FeLV infection observed by physical examination, complete blood count, X-ray, bone marrow aspirate and biochemical. The viral p27 protein is produced in infected cells in high amounts and is found in abundance in the cytoplasm and in body fluids enabling diagnosed methods such as enzyme-linked immunosorbent assay - ELISA and direct immunofluorescence, detection of viral genome (Chain Reaction Polymerase - PCR) and detection of the virus by virus isolation. Although diagnostic tests are highly sensitive, it should be made more than a confirmatory test, especially serological due to variable characteristic of the progress of infection.

Sumário

Resumo.....	1
<i>Abstract</i>	2
INTRODUÇÃO.....	4
REVISÃO DE LITERATURA.....	6
1. Etiologia e Propriedades Gerais.....	6
2. Epidemiologia.....	7
3. Patogenia.....	9
4. Sinais Clínicos.....	9
5. Diagnóstico.....	12
5.1 ELISA - Imunoabsorção Enzimática (enzime-linked immunosorbent assay).....	14
5.2 Imunofluorescência Direta (DFA).....	14
5.3 Imunofluorescência Indireta (IFA).....	15
5.4. PCR- Reação em Cadeia da Polimerase.....	16
5.5. Isolamento viral.....	16
CONCLUSÃO.....	18
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	19

Introdução

O vírus da leucemia felina (FeLV) é um retrovírus, envelopado composto por fita simples de RNA transcrito pela enzima transcriptase reversa (RT) (HARTMANN, 2006).

A replicação viral ocorre quando o vírus penetra na célula e induz a enzima transcriptase reversa produzir DNA a partir do RNA viral.

Há quatro subgrupos no FeLV: FeLV-A é a forma transmissível do vírus, e está presente em todos os animais positivos, podendo ou não estar acompanhado do FeLV-B, FeLV-C e/ou FeLV-T.

O FeLV possui distribuição mundial. A ocorrência em vários países é estimada entre 1% a 8% na população de gatos domésticos, podendo atingir até 20% entre gatos enfermos (LEVY, 2000). No Brasil, a ocorrência foi estimada em 1,6% nos felinos sadios e 10,8% em felinos enfermos (RECHE et al., 1997).

As taxas de infecção são altas em gatos de vida livre porque é necessário contato direto com animal infectado para que ocorra a transmissão.

A concentração viral é mais alta na saliva do que no plasma, dessa forma, a transmissão ocorre principalmente pelo contato com esse fluido. A infecção é elevada em aglomerados de animais nos quais comportamentos sociais de compartilhamento de vasilhas de alimento, água e lambeduras, predispõem à transmissão, apesar de o vírus ser rapidamente inativado no ambiente.

Após exposição oronasal, a replicação viral ocorre nas tonsilas e linfonodos regionais em linfócitos B (infecção aguda). Em gatos imunocompetentes não ocorre replicação viral devido a uma efetiva resposta imune celular. A infecção inicial, se o sistema imune não intervém adequadamente, passa a disseminar por células mononucleares infectadas (linfócitos e monócitos). O vírus infecta órgãos alvo como timo, baço, linfonodos e glândulas salivares. Os tecidos linfóides da cavidade abdominal, são os mais importantes. Após três a seis semanas, o animal apresenta viremia, sendo esta fase caracterizada como viremia passageira. Esses animais também apresentam resposta imune competente contra novas infecções (BARR et al., 1997).

Seguindo, são infectadas células precursoras da medula óssea e células epiteliais intestinais, que são tecidos em constante mitose. Nessa fase, a resposta imune do hospedeiro determina a progressão do vírus. Após infecção da medula óssea os animais podem eliminar a viremia, mas não poderão eliminar a infecção devido à presença do DNA proviral em células-tronco. O animal entra em fase de infecção latente (BARR et al., 1997). Se a resposta imune não for efetiva, os neutrófilos e plaquetas da medula óssea infectados atingem a circulação sanguínea se disseminando pelo organismo do animal, principalmente em tecidos epiteliais como glândulas salivares, bexiga e intestino, caracterizando assim a viremia que, pode tornar o animal persistentemente virêmico e disseminar o vírus ao longo da vida. Esta fase é denominada de viremia persistente. (SOUZA & TEIXEIRA, 2003; ROJKO & KOCIBA, 1991)

De modo geral, os gatos apresentam mucosa pálida, dispnéia, letargia, anorexia, emagrecimento progressivo, febre, gengivite/estomatite, uveíte, diarreia e abscessos que não cicatrizam. Ao exame clínico se observa aumento de tamanho em baço e fígado. Em animais com FeLV, também são encontrados linfomas, leucemias linfóides e mielóides e fibrossarcoma (BARR et al., 1997).

O linfoma é a principal neoplasia causada pelo FeLV, é encontrado em cerca de 80 a 90% dos gatos com linfoma tímico e em 60% dos casos de linfoma multicêntrico e apenas 30% dos gatos com linfoma alimentar (JARRETT & HOSIE, 2006).

Diferentes exames de diagnóstico direto e indireto estão disponíveis para a FeLV em felinos. Dentre estes os testes de ELISA, imunofluorescência, reação em cadeia pela polimerase e isolamento viral são os mais fidedignos.

O teste para infecção do FeLV e, conseqüente separação de gatos positivos, é a principal forma de prevenir a disseminação da infecção.

Revisão de Literatura

1. Etiologia e Propriedades Gerais

O Vírus da leucemia felina (FeLV) foi descrito em 1964 por William Jarrett e colaboradores ao encontrarem partículas virais ligadas à membrana de linfoblastos em gato com linfoma. O FeLV pertence à família *Retroviridae*, sub-família Oncornavirus (grupo de Retrovírus oncogênicos de mamíferos com a indução lenta de leucemias e linfomas). O vírus envelopado, composto por fita simples de RNA (ácido ribonucléico), transcrito pela enzima transcriptase reversa (RT) (HARTMANN, 2006).

O vírus da FeLV possui o gene “gag” que codifica proteínas estruturais internas (p15c, p12, p27 e p10), o gene “pol” que codifica proteínas envolvidas na replicação viral (Integrase, TR) e o gene “env” que codifica proteínas do envelope viral (gp70 e p15e) (HARTMANN, 2006). Como todos os retrovírus, o FeLV possui envelope externo no qual estão inseridas as glicoproteínas e proteínas virais (gp70 e p15e respectivamente) que permitem sua ligação com a célula. A gp27 interage com receptores existentes em várias células, permitindo a replicação do vírus em grande variedade celular do organismo do animal infectado. Já a p15e funciona como mediadora da imunossupressão e da anemia. Essas proteínas representam o alvo para os anticorpos neutralizantes produzidos pelo sistema imunológico do hospedeiro (SOUZA & TEIXEIRA, 2003).

A replicação viral ocorre quando o vírus penetra na célula e induz a enzima transcriptase reversa produzir DNA a partir do RNA viral. Esse DNA, chamado de provírus, migra para o núcleo celular e se incorpora ao DNA genômico da célula infectada que transmitirá para as células filhas o DNA proviral, que tem como função a regulação e o controle da expressão dos genes virais. Dessa forma, o provírus codifica para o RNA-mensageiro, iniciando a produção de RNA viral e todas as proteínas virais no citoplasma da célula infectada (HAGIWARA, 1997). O novo vírus formado no interior da célula é eliminado, na maioria das vezes por brotamento na membrana celular (contínua produção viral pela célula) causando a viremia persistente ou destruição da célula. Este provírus contém seqüências

repetidas (LTRs) nas extremidades 5'e 3'. Entre as LTRs encontram-se os genes "gag", "pol" e "env". Dentro das LTRs existem "seqüências amplificadoras" (UREs) freqüentemente encontradas em gatos com leucemia mielóide que podem estar associadas à oncogênese (NISHIGAKI et al., 1997). Retrovíroses exógenas (externa, "patogênica") e endógenas (herdada, "não patogênica") são encontradas em gatos. Retrovírus exógenos incluem FeLV, Vírus da Imunodeficiência Felina (FIV) e Vírus Formador de Sincício (FeSFV), e os endógenos são o vírus RD-114, enFeLV e vírus MAC-1 (HARTMANN, 2006).

Há quatro subgrupos no FeLV: FeLV-A é a forma transmissível do vírus, e está presente em todos os animais positivos, podendo ou não estar acompanhado do FeLV-B, FeLV-C e/ou FeLV-T. Este subgrupo é o menos patogênico, resulta geralmente em viremia transitória, com ou sem período subsequente de latência (HARTMANN, 2006). FeLV-B, subgrupo do Tipo A, pode causar doenças mieloproliferativas ou mielossupressão. FeLV-C está relacionado a anemia com completa interrupção da diferenciação eritróide. Já o FeLV-T, também subgrupo do tipo A, tem tropismo pelos linfócitos e causa depleção linfóide e imunodeficiência (SOUZA & TEIXEIRA, 2003).

2. Epidemiologia

O FeLV possui distribuição mundial. A ocorrência em vários países é estimada entre 1% a 8% na população de gatos domésticos, podendo atingir até 20% entre gatos enfermos (LEVY, 2000). No Brasil, a ocorrência foi estimada em 1,6% nos felinos sadios e 10,8% em felinos enfermos (RECHE et al., 1997).

As taxas de infecção são altas em gatos de vida livre porque é necessário contato direto com animal infectado para que ocorra a transmissão. Em Detroit, Estados Unidos, a prevalência de anticorpos foi encontrada em 63% dos gatos relacionada ao tempo em que os animais permaneciam fora das residências e com alto grau de exposição. Ao contrário, em gatos confinados de Nova York a freqüência foi de somente 5% (PEDERSEN, 1988). A concentração viral é mais alta na saliva do que no plasma, dessa forma, a transmissão ocorre principalmente pelo contato com esse fluido. A infecção é elevada em aglomerados de animais nos quais

comportamentos sociais de compartilhamento de vasilhas de alimento, água e lambeduras, predisõem à transmissão, apesar de o vírus ser rapidamente inativado no ambiente. Devido a rápida inativação, não é necessário período de desinfecção anterior à introdução de novo animal em um ambiente. O FeLV não é considerado vírus de alta disseminação em hospitais veterinários, desde que animais positivos sejam mantidos separados, haja desinfecção freqüente das gaiolas e que os veterinários possuam o hábito de lavar as mãos após o manejo dos animais (HARTMANN, 2006).

A transmissão vertical ocorre nos filhotes de gatas virêmicas. Ocasionalmente, pode ocorrer transmissão durante lambedura e limpeza dos filhotes. A prenhez pode induzir a reativação da infecção da forma latente e resultarna infecção dos filhotes (HARTMANN, 2006).

A susceptibilidade à infecção pelo FeLV é influenciada pela dose viral infectante, genótipo viral, resistência do susceptível, idade e condição imunológica do hospedeiro (HOOVER & MULLINS, 1991). A idade é fator limitante da infecção devido à imunocompetência crescente do gato (ROJKO & KOCIBA, 1991).

A mortalidade de animais persistentemente virêmicos em aglomerados de gatos é aproximadamente 50% em dois anos e 80% em três anos (LEVY, 2000). Em gatis com Coronavírus felino (FCoV) endêmico, FeLV, Vírus da imunodeficiência felina (FIV) ou todas essas infecções, a infecção por FeLV tem maior contribuição na mortalidade. A maioria dos gatos é levada ao veterinário devido à anemia ou imunossupressão. De 8.642 gatos FeLV positivos, 15% apresentaram co-infecções (PIF, infecções respiratórias, FIV), 11% apresentaram anemia, 6% linfoma, 5% leucopenia ou trombocitopenia e 4% com leucemia ou doença mieloproliferativa (HARTMANN, 2006).

3. Patogenia

Após exposição oronasal, a patogênese da infecção pelo FeLV, segundo Barr et al. 1997, pode ser dividida em vários estágios: Inicialmente ocorre replicação viral nas tonsilas e linfonodos regionais em linfócitos B (infecção

aguda). Em gatos imunocompetentes não ocorre replicação viral devido a uma efetiva resposta imune celular. Esses animais possuem elevado número de anticorpos neutralizantes e permanecem protegidos por anos contra novas infecções. Após a infecção inicial, se o sistema imune não intervém adequadamente ocorre disseminação viral por células mononucleares infectadas (linfócitos e monócitos). O vírus infecta órgãos alvo como timo, baço, linfonodos e glândulas salivares. Os tecidos linfóides da cavidade abdominal principalmente os relacionados ao sistema digestório, são os mais importantes. Após três a seis semanas, o animal apresenta viremia, sendo esta fase caracterizada como viremia passageira. Esses animais também apresentam resposta imune competente contra novas infecções (BARR et al., 1997).

Após três semanas de viremia, são infectadas células precursoras da medula óssea e células epiteliais intestinais, que são tecidos em constante mitose. Nessa fase, a resposta imune do hospedeiro determina a progressão do vírus. Após infecção da medula óssea os animais podem eliminar a viremia, mas não poderão eliminar a infecção devido à presença do DNA proviral em células-tronco. O animal entra em fase de infecção latente. Os gatos podem apresentar reativação da infecção em casos de imunossupressão e fêmeas podem apresentar reativação durante a gestação (BARR et al., 1997). Se a resposta imune não for efetiva, os neutrófilos e plaquetas da medula óssea infectados atingem a circulação sanguínea se disseminando pelo organismo do animal, principalmente em tecidos epiteliais como glândulas salivares, bexiga e intestino, caracterizando assim a viremia que, se permanecer por mais de 16 semanas, provavelmente, o animal se tornará persistentemente virêmico e disseminará o vírus ao longo da vida. Esta fase é denominada de viremia persistente. Os animais apresentam baixos níveis de anticorpos neutralizantes e o vírus replica na medula óssea, linfonodos e glândulas salivares (SOUZA & TEIXEIRA, 2003; ROJKO & KOCIBA, 1991)

A maioria dos gatos que entraram em contato com o vírus podem se recuperar e tornar-se não viremicos, pois, o vírus induz resposta imune que elimina a infecção principalmente antes de atingir a medula óssea (BARR et al., 1997).

Podemos classificar os animais expostos ao vírus da seguinte forma:

1) Regressiva com infecção extinta: há produção de anticorpos contra a gp 70 que é capaz de neutralizar o vírus (início da infecção) e torna-se resistente a infecções. Nestes animais, a produção de anticorpos neutralizantes é maior nos que nos gatos persistentemente virêmicos (SOUZA & TEIXEIRA, 2003).

2) Progressiva ou persistentemente virêmico: ocorre quando o vírus progride por todos os estágios. Tanto o vírus livre quanto o associado as células estão presentes no sangue e há disseminação para tecidos glandulares múltiplos e epiteliais, incluindo as glândulas salivares e mucosas da faringe e laringe, potencializando a transmissão. A viremia persistente ocorre em aproximadamente 30% dos gatos. Porém, filhotes infectados intra-útero ou entre 6-14 semanas geralmente não são capazes de desenvolver resposta imune, passando para 80% dos animais com viremia persistente (ROJKO & KOCIBA, 1991).

3) Gato com viremia transitória (forma latente): A forma latente ocorre quando há infecção viral na medula óssea e em outros tecidos. Porém, o organismo do animal é capaz de inativar o vírus mas não de eliminá-lo completamente, podendo haver reativação viral como causa de estresse, doenças concomitantes, altas taxas de cortisol ou qualquer fator que diminua a resposta imune do animal. Apesar da denominação de latência o vírus é continuamente eliminado no soro ou plasma abaixo dos níveis de detecção por técnicas sorológicas. A maioria dos gatos com esse tipo de infecção extingue a doença e raramente apresentam FeLV produtiva (SOUZA & TEIXEIRA, 2003).

4) Atípica: é quando há replicação viral , mas o animal não tem sinais da doença nem a transmite porém, assim como a latência, os gatos podem vir a desenvolver a viremia persistente (BARR et al., 1997).

Cerca de 70% a 100% dos gatos neonatos tornam-se persistentemente virêmicos, ao passo que menos de 30% dos gatos jovens e adultos apresentam viremia persistente (BARR et al., 1997).

4. Sinais Clínicos

As afecções relacionadas ao FeLV ocorrem principalmente em animais entre 2 a 4 anos de idade devido a infecção quando filhote. O período de incubação de 2 a

4 anos para que ocorra a seqüência dos eventos genéticos que levam ao desenvolvimento da doença. (JARRETT & HOSIE, 2006). De modo geral, os gatos apresentam mucosa pálida, dispnéia, letargia, anorexia, emagrecimento progressivo, febre, gengivite/estomatite, uveíte, diarréia e abscessos que não cicatrizam. Ao exame clínico se observa aumento de tamanho em baço e fígado. Em animais com FeLV, também são encontrados linfomas, leucemias linfóides e mielóides e fibrossarcoma (BARR et al., 1997).

A imunossupressão é a mais preocupante manifestação da viremia pelo FeLV. A infecção persistente diminui a imunocompetência do hospedeiro, gerando neutropenia, disfunção neutrofílica, supressão da blastogênese linfocitária, lise dos linfócitos T, depleção dos linfócitos CD4+ e CD8+ e formação de complexos imunes, provocando depleção de anticorpos circulantes. A imunossupressão pode ser tão grave que filhotes morrem manifestando a atrofia tímica e depleção linfóide (COUTO, 1994). Na imunodeficiência causada pelo FeLV observam-se estomatites, dermatites, abscessos, enterites e otites devido a infecções secundárias de origem bacteriana, viral e parasitária, recidivantes (BARR et al., 1997). Podem ocorrer ainda infecções mais graves como micoplasmose, toxoplasmose, criptococoses ou co-infecção com FIV (vírus da imunodeficiência felina), ou PIF (peritonite infecciosa felina) [BARR et al., 1997].

Ocasionalmente entre os gatos apresentam claudicação ou fraqueza dos membros torácicos e pélvicos decorrentes da poliartrite neutrofílica devido ao depósito de imunocomplexos (COUTO, 1994). A glomerulonefrite é secundária a deposição de imunocomplexos, podendo desenvolver síndrome nefrótica com progressiva hipoalbuminemia, edema e uremia (BARR et al., 1997).

O FeLV pode causar infertilidade, morte fetal, abortamento e queda no rendimento reprodutivo dos gatos. No sistema nervoso, determina paralisia e paresia de membros pélvicos (associados ou não ao linfoma no canal medular), hiperestesia e incontinência urinária (SOUZA & TEIXEIRA, 2003).

5.Diagnóstico

O diagnóstico da FeLV é baseado nos achados epidemiológicos, sinais clínicos e exames subsidiários.

O principal achado clínico-laboratorial é a anemia. Os gatos são particularmente mais susceptíveis a anemia, pois seus eritrócitos possuem expectativa de vida de apenas 70 a 80 dias (JARRETT & HOSIE, 2006). Comumente se observa hipoplasia eritróide que é progressiva, degenerativa e fatal, causada pelo comprometimento na diferenciação das células precursoras eritróides na medula óssea, não havendo hematopoiese extramedular (BARR et al., 1997). A anemia de caráter não regenerativo pode ser atribuída às doenças inflamatórias ou desordem primária na medula óssea. Nas doenças inflamatórias, acredita-se que ocorra retenção das reservas de ferro no sistema monocítico fagocitário, hepatócitos e células epiteliais intestinais, restando ferro insuficiente para a hematopoiese, causando a anemia. Muitos gatos infectados possuem hemácias nucleadas no esfregaço sanguíneo, mas não anemia verdadeiramente regenerativa, que pode ser diferenciada com uma contagem de reticulócitos. (BARR et al., 1997)

A anemia hemolítica imunomediada também pode estar presente em razão dos imunocomplexos na circulação ou em decorrência de desordens mielo ou linfoproliferativas (JARRETT & HOSIE, 2006).

A macrocitose sem policromasia ocorre freqüentemente por falha na eritropoiese. Desta forma, não é considerado sinal de regeneração (SOUZA & TEIXEIRA, 2003).

Gatos infectados pelo FeLV apresentam leucopenia por linfopenia e/ou neutropenia. A linfopenia é o resultado mais evidente decorrente da replicação viral nos linfócitos (HARTMANN, 2006). A neutropenia persistente ou cíclica pode levar a leucopenia, decorrente do efeito citopático do vírus nas células precursoras granulocíticas (SOUZA & TEIXEIRA, 2003).

Os animais infectados apresentam também trombocitopenia secundária a diminuição na produção devido à imunossupressão causada pelo FeLV na medula óssea ou por leucemia infiltrativa. As anormalidades nas plaquetas podem ocorrer em

relação ao tamanho, quantidade ou função. Porém, gatos com infecção crônica pelo FeLV podem apresentar trombocitose (HARTMANN, 2006). Devido devido à trombocitopenia, ocorre a liberação de macroplaquetas no sangue; necessitando que estas células sejam diferenciadas das hemácias nas contagens automáticas de células. (COUTO, 1994).

Gatos positivos para FeLV apresentam azotemia, aumento das enzimas hepáticas e aumento da bilirrubina sérica (SOUZA & TEIXEIRA, 2003).

As neoplasias mais comuns associadas ao FeLV são o linfoma, fibrossarcoma e doenças mieloproliferativas.

O linfoma é a principal neoplasia causada pelo FeLV, é encontrado em cerca de 80 a 90% dos gatos com linfoma tímico e em 60% dos casos de linfoma multicêntrico e apenas 30% dos gatos com linfoma alimentar (JARRETT & HOSIE, 2006).

Os linfomas tímicos ou mediastínicos ocorrem no timo de gatos jovens (menos de três anos). O deslocamento cardíaco e derrames torácicos contendo linfócitos T neoplásicos são os responsáveis pelos sinais clínicos de: dispnéia e cianose (BARR et al., 1997), podendo apresentar infiltração em medula óssea (COUTO, 1994). Os linfomas multicêntricos caracterizam-se pela ocorrência de neoplasias em linfonodos e órgãos principalmente da cavidade abdominal como baço, rim e fígado. (BARR et al., 1997). Os sinais clínicos dependem do órgão afetado, mas incluem linfadenopatia, anorexia, depressão e perda de peso. Os linfomas intestinais ou alimentares podem causar bloqueios intestinais ou problemas de má absorção, podendo ocorrer vômitos, diarreia, perda de peso e melena (BARR et al., 1997). O exame radiográfico revela deslocamento dos lobos pulmonares craniais e caudais, elevação da traquéia e efusão pleural em decorrência do linfoma mediastínico (COUTO, 1994).

Diferentes exames de diagnóstico direto e indireto estão disponíveis para a FeLV em felinos. Dentre estes os testes de ELISA, imunofluorescência, reação em cadeia pela polimerase e isolamento viral são os mais fidedignos.

5.1 ELISA - Imunoabsorção Enzimática (enzyme-linked immunosorbent assay):

É o método mais comum e amplamente difundido pela praticidade, facilmente encontrado em “kits” comerciais como “*Snap-CITEcombo FeLV/ FIV test kit, IDEXX Systems, Portland, USA*”. Geralmente estes “kits” contém anticorpos monoclonais anti FeLV p27. Os felinos positivos apresentam alteração de cor enzimática por ligação a anticorpos para a detecção do antígeno p27. O ELISA é capaz de detectar o vírus no plasma sanguíneo a partir do estágio em que a infecção atinge os monócitos e linfócitos circulantes (uma à três semanas). Alguns testes chamados de não invasivos são capazes de detectar o vírus na lágrima ou saliva, porém só serão eficazes se o animal estiver em viremia (SOUZA & TEIXEIRA, 2003).

O resultado positivo para a infecção pelo FeLV significa que o animal está infectado, mas não é possível determinar se ocorreu a infecção da medula óssea. Cerca de trinta por cento dos gatos podem converter para negativos devido à infecção transitória ou ao desenvolvimento de infecção latente. Gatos positivos estão em infecção transitória ou persistentemente virêmicos. Assim, sugere-se que os animais positivos sem sinais clínicos sejam retestados entre 4 a 8 semanas também pelo método de ELISA ou realizar a imunofluorescência direta (DFA), para determinar se a viremia é transitória ou persistente (BARR et al., 1997). Já o teste negativo pode indicar que o animal não está infectado devido a ausência de exposição ao vírus, ao desenvolvimento de anticorpos neutralizantes e a eliminação da infecção. O gato pode estar sob a infecção inicial ou pré-aguda na qual não há antígeno circulante ou pode ter eliminado o vírus do soro, embora esteja sob infecção latente (SOUZA & TEIXEIRA, 2003).

5.2. Imunofluorescência Direta (DFA)

Foi o primeiro teste a ser desenvolvido na de rotina de detecção do FeLV (HARTMANN, 2006). Consiste em identificar o antígeno presente na amostra (tecido, esfregaço sanguíneo, medula óssea) pela reação de antígeno-anticorpo. O

anticorpo é marcado com substância fluorescente e em seguida examinado em microscópio de fluorescência. Na vigência de ligação antígeno-anticorpo é possível a visualização da reação fluorescente, indicando a presença do antígeno na amostra (TIZARD, 2004). A DFA identifica células associadas ao antígeno p27 presentes em neutrófilos e plaquetas do sangue periférico e só resultado positivo depois da infecção da medula óssea (após três semanas da viremia).

Resultados positivos para a DFA indicam que o animal está em viremia e é contagioso. Porém, esse teste não é recomendado como triagem, pois não detecta a fase inicial da infecção (primeira semana) [HARTMANN, 2006]. O antígeno p27 pode ser detectado aproximadamente quatro semanas após a infecção, mas alguns gatos necessitam de até 12 semanas para que ocorra reação positiva (BARR et al., 1997). Dessa forma, o DFA detecta o vírus após a viremia (SOUZA & TEIXEIRA, 2003).

Reações falso-positivas podem ocorrer quando a preparação da amostra é inadequada, presença de aglomerados plaquetários e eosinofilia (HARTMANN, 2006).

Resultados falso-negativos podem ser obtidos no início da infecção, antes que o vírus tenha infectado a medula óssea; em decorrência de esfregaços de má qualidade ou devido a leucopenia grave (BARR et al., 1997).

Quando o DFA é negativo o vírus pode estar em latência ou na fase inicial da infecção (BARR et al., 1997).

5.3. Imunofluorescência Indireta de Membrana (IMI)

O antígeno de membrana celular por oncornavirus felino (FOCMA) é uma proteína que se expressa na membrana celular das células tumorais induzidas por FeLV e pelo FeSV (vírus do sarcoma felino). Sugere-se que seja produto da recombinação genética entre a gp70 de FeLV e seqüências retrovirais endógenas. Anticorpos anti-FOCMA impedem que o animal desenvolva neoplasia relacionada ao FeLV, mas não impedem as moléstias não neoplásicas induzidas pelo FeLV. A presença de anticorpos anti-FOCMA indica infecção pelo FeLV de forma latente,

persistente ou de baixa atividade (BARR et al., 1997). Dessa forma, o teste indireto de imunofluorescência de membrana detecta anticorpos contra o FOCMA, embora não seja utilizado na rotina de diagnósticos

Titulação maiores ou iguais a 8 indica que o gato resistirá ao desenvolvimento de tumores enquanto que um título ≤ 2 indica que o gato não é imune. Os animais com títulos entre 2 e 8 estão em risco de desenvolver o tumor (SOUZA & TEIXEIRA, 2003).

5.4.PCR- Reação em Cadeia da Polimerase

A PCR está se tornando uma técnica vantajosa frente aos métodos sorológicos para a detecção do vírus da FeLV. A técnica é baseada na detecção do DNA proviral em células (leucócitos) do sangue periférico ou aspirado de medula óssea, proporcionando a identificação do vírus independentemente da presença de anticorpos ou de viremia (ARJONA et al., 2006). A técnica de PCR é extremamente sensível e permite a detecção de pequenas quantidades de DNA pró-viral e RNA no sangue (HARTMANN, 2006). O método utilizado para diagnóstico na rotina é a detecção de DNA proviral presente nos leucócitos. Portanto, o genoma viral deve estar integrado à célula do animal, possibilitando o diagnóstico da infecção na sua fase de latência, na qual não há replicação viral e, conseqüentemente, os testes sorológicos não identificam o antígeno. O PCR envolve a amplificação da seqüência genômica do FeLV. Para a realização do PCR é necessário pessoal técnico capacitado e laboratório equipado, pois qualquer erro na técnica destrói o material nucléico viral ou ocorrem contaminações, gerando falsos positivos (HARTMANN, 2006).

5.5. Isolamento viral

O isolamento viral não é utilizado como método diagnóstico na rotina devido ao tempo consumido, pela dificuldade de ser realizado e pela escassez de laboratórios capacitados para a realização desse tipo de diagnóstico. O isolamento viral é utilizado

em pesquisas e confirmações de testes positivos (HARTMANN, 2006). Sabe-se que o FeLV tipo A replica apenas em células de origem felina, das quais, a mais utilizada é a CRFK (“Crendell Feline Kidney”- células de rim de gato). Os subgrupos B e C replicam-se em ampla variedade de células cultivadas em laboratório, inclusive células humanas (JARRETT & HOSIE, 2006).

Conclusão

Os métodos diagnósticos para FeLV são de grande eficácia, possibilitando o diagnóstico dos animais positivos e, conseqüentemente, permitindo nortear ações de controle da disseminação do vírus na população felina.

Os achados clínico-laboratoriais evidentes são a pancitopenia com grave anemia principalmente não regenerativa e imunossupressão. Os animais comumente desenvolvem linfoma.

Dentre os diagnósticos sorológicos o ELISA e a imunofluorescência são os métodos mais difundido devido a alta sensibilidade.

Quando estes testes sorológicos apresentam resultados conflitantes, recomenda-se o uso da PCR, mesmo que não haja sintomatologia o vírus é detectado em sua forma latente.

Uma vez que o gato seja detectado positivo, mesmo em sua fase de latência, deve ser considerado como fonte de infecção e ser isolado dos demais felinos. Este animal deve receber atenção especial e os proprietários devem ser alertados sobre as doenças decorrentes da infecção pelo FeLV.

Bibliografia

ARJONA, A. et al. Evaluation of a novel nested PCR for the routine diagnosis of feline leukemia virus (FeLV) and feline immunodeficiency virus (FIV). **J. Feline Medicine and Surgery**, n.9, p.14-22, 2007.

BARR, M.C. et al. Moléstias virais felinas. In: Ettinger, S.J.; Feldman, E.C (Eds). **Tratado de medicina interna veterinária: moléstias do cão e do gato**. 4.ed. São Paulo, 1997. cap.70, p. 589-631.

COUTO, C.G. Diagnóstico e tratamento de doenças retrovirais em gatos. In: NELSON, R.W.; COUTO, C.G. **Fundamentos de Medicina Interna de Pequenos Animais**. Rio de Janeiro, 1994. cap.91. p.702-705.

HARTMANN, K. Feline Leukemia Virus Infection. In: Greene, C.E. **Infectious disease of the dog and cat**. 3.ed. Georgia, 2006 cap. 13, p.105-131.

HOOVER, E.A.; MULLINS, J.I. Feline leukemia virus infection and diseases. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 199, n.10, p.1287-97, 1991.

JARRETT O.; HOSIE M.J. Infecção pelo vírus da Leucemia Felina. In: CHANDLER E.A. et al. **Clínica e Terapêutica em Felinos**. 3.ed.. São Paulo, 2004. cap.23. p.488-494.

LEVY, J.K. FeLV and non-neoplastic FeLV-related disease. In Ettinger SJ, Feldman EC (eds), **Textbook of veterinary internal medicine**. WB Saunders, Philadelphia 2000, PA, p.424 – 432.

NISHIGAKI K, OKUDA M, ENDO Y, et al. Structure and function of the long terminal repeats of feline leukemia viruses derived from naturally occurring acute myeloid leukemias in cats. **J Virol**, v.71, p.9.823-9.827, 1997.

PEDERSEN NC. 1988. Feline leukemia virus infection, p 83. *In* Pedersen NC (ed), Feline infectious diseases. **American Veterinary Publications**, Santa Barbara, CA.

RECHE, JR, A. et al. Clinical study of acquire immunodeficiency syndrome in domestic cats in São Paulo. **Braz. J. vet. Res. Anim. Sci**, São Paulo, v.34, n.3, 152-55, 1997.

ROJKO, J.L. AND KOCIBA , G.J. Pathogenesis of infection by the feline leukemia virus. **JAVMA**, v. 199, p. 1305, 1991.

SOUZA, H.J.M.; TEIXEIRA, C.H.R. Leucemia Viral Felina. *In*: SOUZA, H.J.M. **Coletanea em Medicina e Cirurgia Felina. 1.ed. Rio de Janeiro, 2003. cap. 22. p.251 – 271.**

TIZARD I.R. **Veterinary Immunology: an Introduction.** Cap16. 7.ed. Editora: São Paulo, 2004.