

**UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL**  
**ÁREA DO CONHECIMENTO: CIÊNCIAS DA VIDA**  
**INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO VÍRUS DA  
LEUCEMIA FELINA DE GATOS DOMÉSTICOS DA REGIÃO DA  
SERRA GAÚCHA**

**JÉSSICA MARTINS TADEU**

CAXIAS DO SUL, 2021

**Jéssica Martins Tadeu**

**DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO VÍRUS DA  
LEUCEMIA FELINA DE GATOS DOMÉSTICOS DA REGIÃO DA SERRA  
GAÚCHA**

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação  
em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul,  
visando a obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. André Felipe Streck

Co-orientadora: Simone Silveira

CAXIAS DO SUL, 2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Universidade de Caxias do Sul  
Sistema de Bibliotecas UCS - Processamento Técnico

T121d Tadeu, Jéssica Martins

Detecção e caracterização molecular do vírus da leucemia felina de gatos domésticos da região da Serra Gaúcha [recurso eletrônico] / Jéssica Martins Tadeu. – 2021.

Dados eletrônicos.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2021.

Orientação: André Felipe Streck.

Coorientação: Simone Silveira.

Modo de acesso: World Wide Web

Disponível em: <https://repositorio.ucs.br>

1. Leucemia - Animais domésticos. 2. Vírus da Leucemia Felina - Serra, Região (RS). 3. Felídeos. 4. Reação em cadeia da polimerase. 5. Ensaio de Imunoabsorção Enzimática. I. Streck, André Felipe, orient. II. Silveira, Simone, coorient. III. Título.

CDU 2. ed.: 619:616.155.392

Catalogação na fonte elaborada pela(o) bibliotecária(o)  
Ana Guimarães Pereira - CRB 10/1460

Jéssica Martins Tadeu

**DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO VÍRUS DA  
LEUCEMIA FELINA DE GATOS DOMÉSTICOS DA REGIÃO DA SERRA  
GAÚCHA**

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação  
em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul,  
visando a obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. André Felipe Streck

Co-orientadora: Simone Silveira

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: \_\_\_ DE \_\_\_\_\_ DE 2021.

---

Orientador: Prof. Dr. André Felipe Streck

---

Co-Orientadora: Prof. Dra. Simone Silveira

---

Prof. Dr. Vagner Ricardo Lunge

---

Prof. Dra. Suelen Paesi

---

Prof. Dra. Graciane Aiello

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho aos gatos pretos, brancos, amarelos, tigrados, tricolores e siameses, dóceis e ferais que passaram pela minha vida me ensinando que amor não se cobra, apenas se dá e se recebe. Aos pacientes que perdi para a FeLV, mas que me ensinaram que amor e compaixão também é deixar ir. A aos seus tutores os quais dividimos tantos momentos de compaixão e angustiantes relacionados a esta doença.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador Prof. Dr. André Felipe Streck, pela oportunidade de realizar este estudo, e por todo auxílio intelectual e financeiro no desenvolvimento deste. Agradeço também por toda compreensão ao longo destes anos.

As pós-doutorandas Simone Silveira e Diéssy Kipper, que me auxiliaram imensamente tanto no início quanto na conclusão deste trabalho. Sem vocês jamais alcançaria este objetivo.

A técnica de laboratório Simone Andriolo, aos meus colegas mestrandos e doutorandos, e aos alunos de iniciação científica por toda amizade e companheirismo desenvolvidos ao longo deste percurso.

A agência de fomento CAPES, pelo suporte financeiro e a Universidade de Caxias do Sul pela infraestrutura que permitiu a realização deste trabalho.

A minha Psicóloga e Cientista Social Mannuelli Tomazzi, por me ajudar a atravessar momentos difíceis que coincidiram com o meu último ano de pós-graduação, sempre me inspirando a explorar o melhor de mim, e a não deixar de acreditar na humanidade e nos meus objetivos.

Às minhas amigas de bolo Caroline Rocha e Larissa Panozzo por todo apoio, nos momentos mais difíceis destes anos.

Aos meus pais, minhas irmãs e minhas tias, por todo amor incondicional, por terem sido meus exemplos e minhas inspirações. Obrigada por fazerem de mim um ser humano melhor.

A Mara Barcarolo por ser mais que uma amiga, uma mãe. Obrigada por todo colo, amor e carinho.

Aos meus filhos felinos Preto, Sansa e Bento por serem os melhores terapeutas do mundo, por me inspirarem e pelo amor genuíno que recebo todos os dias.

A Deus, por me permitir concluir este estudo em meio a pandemia de COVID-19 tendo a minha saúde e a dos que eu amo.

“A educação, se bem compreendida, é a chave  
do progresso moral.”

(Allan Kardec)

## SUMÁRIO

RESUMO .....	8
ABSTRACT .....	9
1. INTRODUÇÃO.....	10
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA GERAL.....	13
2.1 Descoberta do FeLV e suas possíveis origens .....	13
2.2 Taxonomia.....	14
2.3 FeLV exógeno e seus subgrupos .....	16
2.4 Replicação viral.....	17
2.6 Patogenia .....	19
2.7 Sinais clínicos.....	21
2.8 Diagnóstico.....	24
2.9 Tratamento .....	25
2.10 Controle e prevenção.....	26
3. OBJETIVOS .....	28
3.1 Objetivo geral.....	28
3.2 Objetivos específicos.....	28
4. RESULTADOS .....	29
4.1 Capítulo I.....	29
5. DISCUSSÃO GERAL.....	45
6. CONCLUSÕES .....	47
7. BIBLIOGRAFIA COMPLEMENTAR.....	48

## RESUMO

O vírus da leucemia felina (FeLV) é um *Gammaretrovirus*, pertencente à família *Retroviridae*, que infecta felinos domésticos e selvagens. Trata-se de um vírus que causa uma infecção transmitida entre os felinos por fômites, lambeduras ou mordeduras. Clinicamente, a leucemia viral felina pode apresentar diversas síndromes clínicas graves, como neoplasias, leucemias, distúrbios hematológicos, mieloproliferativos, neurológicos, entre outros. O FeLV é composto por uma fita simples de RNA, envolto por um envelope, constituído por três genes *env*, *gag*, *pol*. Atualmente, podemos classificar geneticamente o vírus em cinco subgrupos: FeLV-A, B, C, D e T. O subgrupo A é predominante, porém menos patogênico. Os subgrupos B e C são menos comuns e surgem de recombinações genéticas de vírus exógenos com retrovírus endógenos dos genomas dos gatos infectados. O diagnóstico da doença pode ser realizado por testes rápidos imunocromáticos ou análises moleculares como a reação em cadeia de polimerase (PCR). Entretanto, apesar da disponibilidade dessas ferramentas, ainda há pouca informação sobre a epidemiologia molecular do vírus na região da Serra Gaúcha. O objetivo deste estudo foi detectar e caracterizar geneticamente o FeLV em felinos da Serra Gaúcha. Ao todo 29 amostras de felinos foram colhidas, e selecionadas para o sequenciamento. A idade dos gatos amostrados variou entre três meses e 15 anos. A análise dos dados das amostras sequenciadas mostrou que 26 (89,7%) apresentavam doença ativa, sendo a anemia a alteração hematológica mais frequente. Na análise filogenética, 93,1% (27/29) amostras eram de FeLV-A, e 6,9% (2/29) de FeLV-B. De acordo com os achados do nosso estudo, detectamos uma alta frequência de FeLV-A, o que pode estar fortemente relacionada a região geográfica como já demonstrado em outros estudos. Mais estudos são necessários para que se possa compreender mais sobre a patogênese da doença, bem como de formas de controle e eliminação deste vírus.

**Palavras chaves:** FeLV, felino, PCR, ELISA.

## ABSTRACT

The feline leukemia virus (FeLV) is a *Gammaretrovirus*, from the *Retroviridae* family, which infects domestic and wild felines. It is a virus that causes an infection transmitted among felines by fomites, licks or bites. Clinically, feline viral leukemia can present several serious clinical syndromes, such as neoplasms, leukemias, hematological, myeloproliferative and neurological disorders, among others. FeLV is composed of a single strand of RNA, surrounded by an envelope, consisting of three genes *env*, *gag*, *pol*. Currently, we can differentiate the virus into five subgroups according genetic analysis: FeLV-A, B, C, D and T. Subgroup A is predominant, but less pathogenic. Subgroups B and C are less common and arise from genetic recombinations of exogenous viruses with endogenous retroviruses from the genomes of infected cats . Diagnosis of the disease is performed by rapid immunochromatic tests or molecular analyzes such as polymerase chain reaction (PCR). However, despite the availability of these tools, there is still little information about the molecular epidemiology of the virus in the Serra Gaúcha region. The aim of this study was to detect and genetically characterize FeLV in felines from Serra Gaúcha. A total of 39 feline samples were collected, and 29 selected for sequencing. The age of the sampled cats ranged between three months and 15 years. Analysis of the data from the sequenced samples showed that 26 (89.7%) had active disease, with anemia being the most frequent hematological disorder. In the phylogenetic analysis, 93.1% (27/29) samples were of FeLV-A, and 6.9% (2/29) of FeLV-B. According to the findings of our study, we detected a high frequency of FeLV-A, which may be strongly related to the geographic region, as demonstrated in other studies. More studies are needed to understand more about the pathogenesis of the disease, as well as ways to control and eliminate this virus, since it is an untreated disease.

**Key words:** FeLV, feline, PCR, ELISA.

## 1. INTRODUÇÃO

Atualmente o Brasil é considerado o segundo país com o maior número de animais de estimação em todo o mundo. Segundo os dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), publicados em 2018, o Brasil possui um total de 139,3 milhões de animais de estimação nos lares brasileiros. Desses, 54,2 milhões são cães, e 23,9 milhões são gatos. Os felinos vêm sendo a opção de animal de estimação para muitas pessoas principalmente nas grandes cidades, o que faz com que a população de gatos domiciliados aumente a cada ano (BIEZUS, 2017).

Com esse aumento da população de gatos nos lares brasileiros, houve uma elevação proporcional no diagnóstico das retrovirose felinas, como a imunodeficiência viral felina (FIV, *feline immunodeficiency virus*) e a leucemia viral felina (FeLV, *feline leukemia virus*). Essas doenças têm grande impacto na medicina de felinos, pois são altamente contagiosas e causam graves síndromes clínicas, como as disfunções hematopoiéticas e neoplásicas (BIEZUS, 2017). Além disto, ainda existem evidências que este vírus pode estar envolvido em muitos casos de neoplasias (LEITE FILHO, 2018).

Estudos comprovam que além dos gatos domésticos, espécies de felinos selvagens também apresentam infecção pelo FeLV, um fator extremamente relevante na conservação das espécies, já que esse vírus é altamente contagioso e pode resultar no óbito do felino infectado (MORA et al., 2015; POFFO et al., 2017). A transmissão do vírus pode ocorrer na forma vertical ou horizontal. A transmissão horizontal ocorre principalmente nos gatos que possuem contato frequente, compartilhando vasilhas de comida e água, e também na limpeza mútua, já que grandes quantidades de partículas

virais são liberadas na saliva. A transmissão vertical pode ocorrer *in útero* pela via transplacentária, pela passagem do filhote no canal do parto ou também através do aleitamento materno. Essas variações na transmissão vertical estão relacionadas com a carga viral da mãe durante a gestação, podendo infectar até 70% de uma ninhada (AQUINO, 2012; TURRAS, 2014; BEALL et al., 2019).

O FeLV foi por muito tempo considerado o principal causador de síndromes clínicas diagnosticadas em gatos, bem como tem sido detectado em aproximadamente um terço dos gatos que vieram a óbito por neoplasias. Esses índices são ainda maiores nos casos de mortes vinculadas à anemia ou infecções secundárias, causadas pelos efeitos imunossupressores do vírus (HARTMANN, 2012; GALDO NOVO et al., 2016; CHIU et al., 2018).

Os casos de gatos infectados por FeLV em todo o mundo vem diminuindo a cada ano, devido às medidas de controle como testes, vacinação e isolamento de gatos infectados (WILKES et al., 2018). No entanto, a presença da doença pode estar sendo subestimada, já que estudos comprovam que gatos infectados regressivamente ainda podem desenvolver a doença e seus sinais clínicos ao longo da vida (HARTMANN, 2012).

Poucos estudos epidemiológicos sobre FeLV no Brasil têm sido realizados. Algumas pesquisas revelam uma frequência de 4,5% de gatos infectados nas regiões Centro-Oeste do Brasil (POFFO et al., 2017) e 2,8% dos gatos da região de Mineiros, GO, revelando um maior índice de infecção em felinos machos, não castrados, de livre acesso a rua (LEMOS, 2019). Já em países como Colômbia e Austrália as frequências de gatos FeLV positivos são bem maiores, situando-se em 68% e 43%, respectivamente (RAMÍREZ et al., 2016).

Atualmente, cinco subgrupos diferentes de FeLV são conhecidos, sendo eles FeLV-A, B, C, D e T (WATANABE et al., 2013; CHIU et al., 2018; ORTEGA et al., 2020). A identificação da frequência dos subgrupos é importante no entendimento da patogenia, epidemiologia e controle da doença (COELHO et al., 2008, BIEZUS et al., 2019; ORTEGA et al., 2020)

Este trabalho teve como objetivo detectar o FeLV por meio de teste rápido e PCR (reação em cadeia da polimerase) em pacientes felinos, identificar os subgrupos virais a partir de análise filogenética e realizar uma análise das principais alterações hematológicas dos gatos infectados na região da Serra Gaúcha.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA GERAL**

### **2.1 Descoberta do FeLV e suas possíveis origens**

No início da década de 60, o professor William Jarrett recebeu um grupo de gatos jovens atendidos por um médico veterinário local, apresentando sinais de linfoma. Esses animais possuíam o histórico de viverem em uma mesma colônia, o que despertou o interesse do professor a respeito da possibilidade de o linfoma ser causado por algum tipo de vírus, como ocorria em aves e camundongos (JARRETT, 1999; WILLETT & HOSIE, 2013).

Após alguns anos de pesquisa, em 1964, foi publicado o primeiro estudo relatando a transmissão de linfoma em gatos e a detecção de partículas virais semelhantes ao vírus da leucemia murina nesses tumores. A partir disto, abriu-se o campo da retrovirologia felina, dando início aos estudos sobre o vírus da leucemia felina (JARRETT, 1999; WILLETT & HOSIE, 2013).

Acredita-se que o FeLV tenha origem em um vírus que infectava pequenos roedores, e que em consequência do comportamento predador/presa dos gatos, o vírus passou por uma mutação que permitiu que esse se integrasse ao genoma dos gatos, dando origem aos vírus endógenos (enFeLV) (HARTMANN, 2012). Estudos apontam que o enFeLV seja extremamente antigo e tenha se integrado ao genoma dos felinos antes mesmo da especialização do gênero *Felis*, passando por herança genética a todos os felinos desse gênero (POLANI et al., 2010; CHIU et al., 2018).

A presença desse retrovírus endógeno é frequentemente relatada nos animais, no entanto, suas interações com os retrovírus exógenos não são amplamente estudadas. Pesquisas sugerem que esses retrovírus endógenos tenham um importante papel na

infecção exógena, seja de uma forma protetora contra a infecção, ou até mesmo facilitando a infecção exógena (CHIU et al., 2018; CHIU & VANDEWOUDE, 2020; POWERS et al., 2018).

## 2.2 Taxonomia

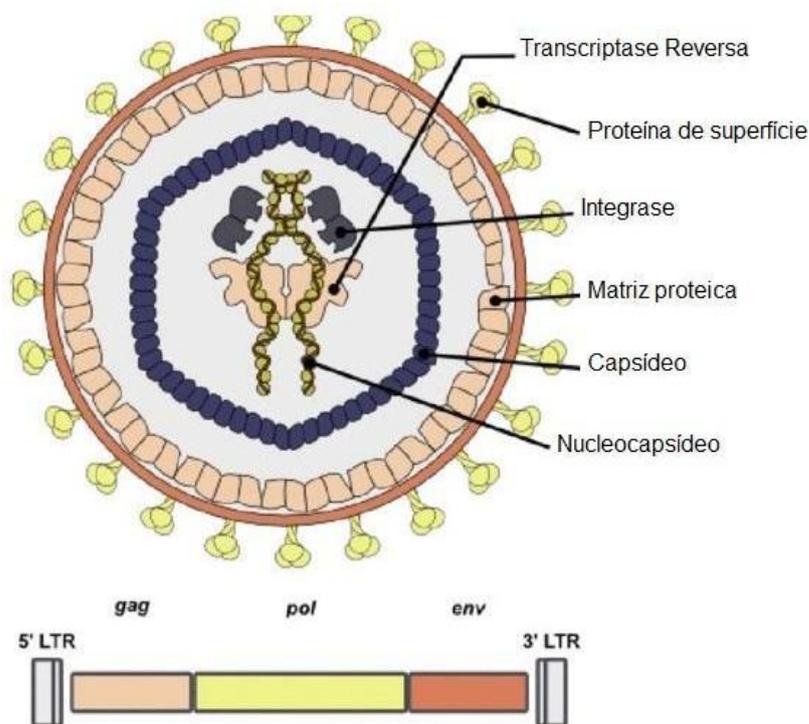
O FeLV é classificado taxonomicamente no gênero *Gammaretrovirus* da família *Retroviridae* o qual infecta felinos domésticos e selvagens. O FeLV foi o primeiro retrovírus felino identificado em 1964, sendo até hoje causador de doenças fatais, relacionadas com neoplasias, alterações hematológicas graves e imunossupressão (STEWART et al., 1986; DANIELS et al., 1999; ARJONA et al., 2007; VICTOR, 2019).

Assim como outros retrovírus, o FeLV é envelopado (Figura 1) e composto por uma fita simples de RNA com 8,4 kb de extensão. A estrutura genômica do vírus é composta por três regiões principais: *gag* (grupo associado ao antígeno), *pol* (polimerase) e *env* (envelope) (CHIU et al., 2018; ORTEGA et al., 2020), seguidas por sequências reguladoras não-traduzidas, as chamadas LTR (*long terminal repeats* - longas repetições de terminal) na região 5' e 3' (WILLETT & HOSIE, 2013; VICTOR, 2019).

O gene *gag* é responsável por codificar as proteínas do capsídeo, nucleocapsídeo e matriz, o gene *pol* codifica a transcriptase reversa, e o gene *env* codifica as proteínas da superfície e a região transmembrana do envelope (COELHO et al., 2008; RAMÍREZ et al., 2016). Já as LTRs são responsáveis pela sinalização para a transcrição reversa e integração do provírus ao genoma do gato infectado (AQUINO, 2012; MIYAKE et al., 2016).

Dentre as glicoproteínas de superfície codificadas pelo gene *env*, uma delas é a gp70 que é a proteína responsável por caracterizar o alvo do vírus, através do tropismo deste por células específicas (BOLIN & LEVY, 2011; BIEZUS, 2017). Desta forma, sabe-se que o gene *env* apresenta um papel importante nas recombinações para formar os diferentes subgrupos, influenciando também nos múltiplos desfechos da doença (WATANABE et al., 2013).

### Vírião e estrutura genômica do FeLV



**Figura 1:** Estrutura genômica do vírião FeLV, composta por três genes principais, sendo *gag* o gene relacionado ao antígeno, *pol* a polímerase e *env* ao envelope. Seguidas por sequências reguladoras não traduzidas, as LTR. A estrutura do vírus também compreende as proteínas matriz (MA), capsídeo (CA) e nucleocapsídeo (NC), as enzimas transcriptase reversa e integrase, bem como as proteínas de superfície. Adaptado de ROSADO, 2009.

O capsídeo apresenta uma proteína principal denominada de p27 com grande relevância no diagnóstico, pois é facilmente detectada nos testes de ensaios enzimáticos, conhecidos como ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay* - ensaio

imunoabsorvente enzimático) (TORRES et al., 2005). Essa proteína viral estrutural é produzida já no estágio primário da infecção e, continuamente, nos gatos com infecção progressiva (KRECIC et al., 2018).

### **2.3 FeLV exógeno e seus subgrupos**

O FeLV exógeno é usualmente dividido em cinco subgrupos (FeLV-A, FeLV-B, FeLV-C, FeLV-D, FeLV-T) de acordo com diferenças genéticas e quadros clínicos (WATANABE et al., 2013; CHIU et al., 2018; ORTEGA et al., 2020). O FeLV-A é considerado o único subgrupo que pode ser transmitido entre gatos. É o menos patogênico, porém o animal pode desenvolver patologias como anemia, imunossupressão e linfoma (CHIU et al., 2018; MIYAKE et al., 2019). O FeLV-B surge da recombinação com enFeLV. Esse subgrupo está relacionado principalmente com o desenvolvimento de neoplasias. A emergência desse subgrupo ocorre em cerca de 50% dos gatos infectados com o FeLV-A (ORTEGA et al., 2020; ERBECK et al., 2021). A variação do vírus classificada com FeLV-C, teve origem em uma mutação no gene *env* do FeLV-A, sendo o menos comumente encontrado nos gatos infectados, e é relacionado com casos de anemia aplásica (CHIU et al., 2018; MIYAKE et al., 2019).

O subgrupo FeLV-D, assim como o B, surge de uma recombinação de genes do FeLV-A com o enFeLV (MIYAKE et al., 2019). O FeLV-T e o FeLV-TG35 apresentam tropismo por linfócitos T, desenvolvendo um efeito citopático grave. O FeLV-TG35, por apresentar receptores diferentes do FeLV-T, foi classificado como uma variante do FeLV-T (MIYAKE et al., 2016; ORTEGA et al., 2020).

## 2.4 Replicação viral

Após a transmissão ao felino, o vírus passa a estar presente nas tonsilas e orofaringe, interagindo com os receptores celulares. Os subgrupos parecem interagir com receptores diferentes. Por exemplo, o FeLV-A interage com a célula do hospedeiro através das proteínas transportadoras de tiamina (THTR1), amplamente distribuído em todos os tecidos dos gatos, facilitando a disseminação. O FeLV-B se liga à célula por meio da proteína transportadora de fosfato (Pit-1 e Pit-2), já o FeLV-C realiza a sua entrada da célula por meio da proteína transportadora de tiamina (FLVCR1), amplamente presente em tecidos hematopoiéticos. A perda de função desse transportador, ocasionada pelo vírus, leva ao desenvolvimento de severos quadros anêmicos (WILLETT & HOSIE, 2013).

Após a interação do vírus com as células hospedeiras, inicia-se a replicação viral, onde na primeira fase ocorrerá a inserção do FeLV no genoma do hospedeiro. Para que ocorra essa inserção, o genoma viral precisa ser transcrito de RNA para DNA, ação realizada pela enzima transcriptase reversa (RT). Depois que essa cópia de DNA é sintetizada, o DNA viral se integra ao genoma do gato hospedeiro pela ação da enzima integrase (VICTOR, 2019). Nessa etapa, o DNA proviral desloca-se para o núcleo durante a divisão celular e se incorpora ao DNA cromossômico do hospedeiro com o auxílio de uma integrase. Esse DNA integrado passa a ser transmitido às células-filhas junto com outros genes. O provírus também codifica para RNA-mensageiro, estabelecendo a produção de um novo RNA viral no citoplasma da célula infectada. Sucede-se então a síntese ativa de proteínas virais que são encontradas no interior das células infectadas ou no plasma sanguíneo (SOUZA & TEIXEIRA, 2003; HARTMANN & HOFMANN-LEHMANN, 2020).

## 2.5 Epidemiologia

O FeLV é visto com maior frequência em felinos domésticos, sendo raro ou ausente nos felinos selvagens. No entanto, os relatos de infecção pelo FeLV nessas espécies vêm se tornando cada vez mais comuns, o que representa uma ameaça à sobrevivência desses felinos em todo o mundo (FROMONT et al., 2000; MORA et al., 2015; SILVA et al., 2016). No Brasil, estudos detectaram a presença de DNA do FeLV em uma jaguatirica (*Leopardus pardalis*), um gato-do-mato (*Leopardus tigrinus*) e dois jaguarundis (*Herpailurus yagouarondi*), esses últimos nascidos em cativeiro (FILONI et al., 2017).

A prevalência de FeLV em felinos domésticos, tem sido estudada no mundo ao longo dos anos. Altas incidências de gatos FeLV-positivos foram descritas em países como Colômbia e Austrália (positividade de 59% e 43%, respectivamente) (NORRIS et al., 2007; ORTEGA et al., 2020). No entanto, estudos nos Estados Unidos demonstraram uma prevalência intermediária de FeLV de 15-20% (LEVY et al., 2003), assim como na Espanha e na Suíça de 33% e 35%, respectivamente (HOFMANN-LEHMANN et al., 2001; LEVY et al., 2003; ARJONA et al., 2007). Baixos índices foram encontrados no Japão (2,9%), na Alemanha (3,6%) e na Nova Zelândia (1,0%) (MARUYAMA et al., 2003; GLEICH et al., 2009; GATES et al., 2017). Além disso, no Canadá, taxas inferiores também foram descritas, apresentando apenas entre 3-4% de gatos infectados na sua população. Esses índices se devem aos rigorosos métodos de controle do país, no qual foi instituído o teste para todos os animais que passassem por hospitais e clínicas veterinárias, bem como a eutanásia dos felinos infectados (LEVY et al., 2003; RAMÍREZ et al., 2016).

No Brasil, estudos realizados detectaram uma grande diversidade de positividade para FeLV, de acordo com a região e a metodologia diagnóstica. O *Snap*

*Test* aplicado em gatos doentes na região de São Paulo (centro-oeste) revelou uma prevalência de FeLV de 10,8% (HAGIWARA et al., 1997). Outro estudo realizado em Minas Gerais, através da técnica de *nested*-PCR, revelou uma taxa de infecção de 47% em animais saudáveis coletados entre 2008 e 2011 (COELHO et al., 2011). No estado Rio de Janeiro, gatos domésticos foram coletados e testados para o ensaio de imunofluorescência indireta para o antígeno p27, e os resultados mostraram uma prevalência de 11,5% de animais positivos para FeLV (DE ALMEIDA et al., 2012). No estado de Mato Grosso, a taxa de prevalência da infecção foi de 4,5% (POFFO et al., 2017). Estudo realizado nas cidades de Ilhéus e Itabuna, no estado da Bahia, relatou prevalência de 3% nos ensaios de *nested*-PCR para FeLV (LACERDA et al., 2017). E, mais recentemente, um estudo produzido na região sul do Brasil, no estado de Santa Catarina, relatou uma taxa de prevalência de 41% em gatos doentes e de 9,8% em gatos saudáveis (BIEZUS et al., 2019).

Como principais fatores alvos para a infecção de FeLV, estão os felinos machos, não castrados, com idade superior a um ano e com livre acesso a rua (LEVY, et al., 2008). Porém, um estudo realizado por DA COSTA et al. (2017) detectou em sua análise que gatos positivos para a FeLV, com idade abaixo de um ano, têm as maiores probabilidades de manifestar anemia e leucopenia, isso pode ocorrer em virtude do número maior de receptores celulares fundamentais para o FeLV infectar as células e iniciar a replicação. Esses receptores encontram-se em menor número em felinos mais velhos (ALVES et al., 2015).

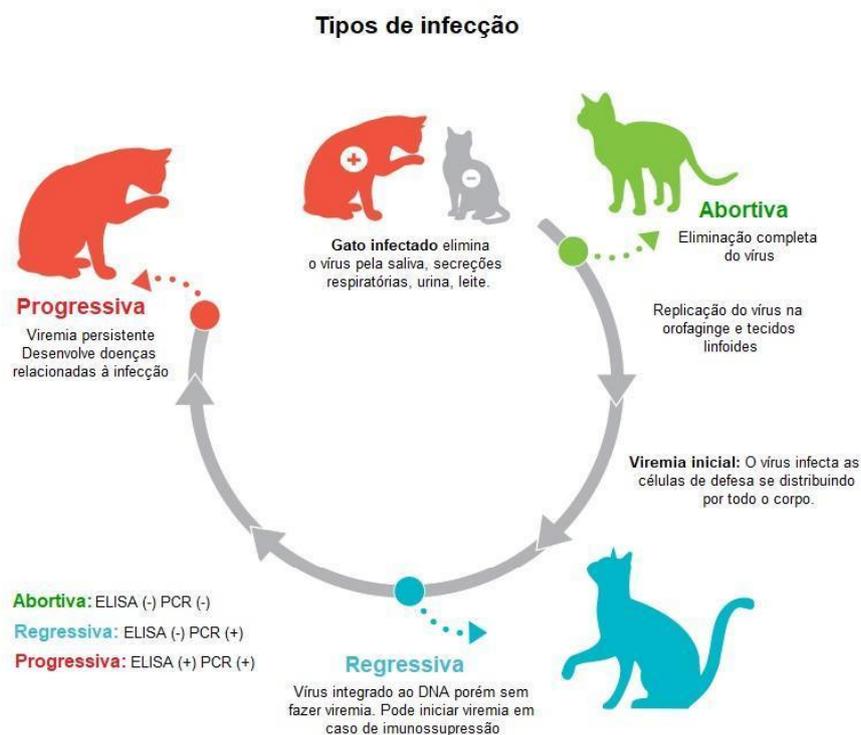
## **2.6 Patogenia**

A infecção pelo FeLV se inicia através do contato de um gato saudável com secreções de um gato contaminado, ocorrendo a entrada do vírus, principalmente, pela via oronasal, onde esse se depositará nos tecidos linfoides locais. Nesse local, ele realizará a sua interação com os receptores específicos de cada subgrupo para efetuar a sua entrada nas células, infectando linfócitos e macrófagos. Após a entrada na célula, o vírus inicia a sua replicação viral e dissemina-se através da circulação dos linfócitos e monócitos (WILLETT & HOSIE, 2013; BIEZUS, 2017). A partir disso, podem ocorrer diferentes desfechos da infecção, os quais dependerão de vários fatores como: idade, sistema imune e saúde do gato exposto. Os diferentes tipos de infecção que podem ocorrer nos gatos após a exposição ao vírus são classificados como: infecção abortiva, regressiva e progressiva (Figura 2) (LITTLE, S. et al., 2020).

A primeira delas, a infecção abortiva, ocorre quando o sistema imunológico do gato combate o vírus em sua totalidade, eliminando-o completamente logo após a replicação local, sendo provavelmente causada quando um gato é exposto a baixas doses de FeLV (HARTMANN, 2012; LITTLE, S. et al., 2020).

A infecção regressiva é caracterizada pela ausência de viremia, porém com presença do vírus no DNA na medula óssea ou outros tecidos, mas não na circulação, sendo detectável apenas em testes de PCR. Nesse caso, o animal pode reativar a viremia em qualquer momento da vida (LITTLE, S. et al., 2020). Ainda, nessa infecção, durante a divisão celular, o DNA proviral é replicado e a informação é dada às células filhas. Assim, linhagens celulares completas podem conter DNA proviral de FeLV. No entanto, o DNA proviral não é traduzido em proteínas e nenhuma partícula viral infecciosa é produzida. Portanto, gatos com infecção regressiva não excretam FeLV e não são contagiosos para outros gatos (HARTMANN, 2012).

A infecção progressiva é aquela em que o sistema imune não combate a infecção e o animal torna-se uma fonte de disseminação do vírus e desenvolve sintomas relacionados à infecção (LITTLE, S. et al., 2020). Essa fase se inicia quando o vírus atinge a medula óssea na qual estão as células de rápida replicação, iniciando a viremia em poucas semanas, e perpetuando o material genético do vírus em cada célula formada na medula, fator determinante para a persistência da infecção (HARTMANN, 2012; BIEZUS, 2017).



**Figura 2:** Diferentes desfechos da infecção pelo vírus da FeLV. Após o contato com vírus, o felino infectado pode apresentar diferentes formas de progressão da doença, sendo elas a infecção abortiva, regressiva ou progressiva Adaptado de: Little, S. et al. Feline Retrovirus Testing and Management Guidelines, 2020.

## 2.7 Sinais clínicos

O desfecho da infecção pelo FeLV pode ser diferente entre os gatos. Fatores como *status* imunológico, idade, carga viral e subtipo do vírus determinam a forma clínica de desenvolvimento da doença (HARTMANN, 2012; SYKES & HARTMANN, 2014; ORTEGA et al., 2020). Dentre as formas de desenvolvimento da doença, as citoproliferativas como os quadros leucêmicos, ou síndrome mielodisplásica, anemia aplásica e imunodeficiências são as mais comuns (NESINA et al., 2015). Cerca de 25% dos gatos FeLV positivos irá apresentar anemia, causada por fatores como a instalação do vírus na medula óssea, ou a própria destruição dos eritrócitos pelo sistema imunológico (SYKES & HARTMANN, 2014; DA COSTA et al., 2017; ORTEGA et al., 2020).

O FeLV é um importante causador de imunossupressão, o que predispõe os gatos virêmicos a todo tipo de infecção secundária, como por exemplo, a infecção pelo coronavírus causador da peritonite infecciosa felina (PIF), hemoparasitas ou doenças respiratórias que podem agravar o quadro ou até mesmo levar o gato ao óbito (COTTER, 1991; AQUINO, 2012; HARTMANN, 2012). Dentre as alterações hematológicas não neoplásicas causadas pela FeLV, as frequentemente observadas são: anemia, trombocitopenia e leucopenia. As possíveis causas para essas alterações são o efeito supressor do vírus na medula óssea, bem como a interrupção ou inativação dos genes que ocorrem nas células infectadas (HARTMANN, 2012; BIEZUS, 2017).

A anemia causada pela infecção viral das células-tronco hematopoiéticas é classificada como normocítica ou macrocítica, normocrômica e não regenerativa, apresentando baixa contagem de reticulócitos. A anemia hemolítica imunomediada está presente em 10% dos casos, além disso, é uma das manifestações causadas pelo vírus, já que esse pode causar uma infiltração neoplásica na medula, levando à expressão de antígenos estranhos na superfície das hemácias, e conseqüentemente, a sua destruição,

assim como ocorre nas hemácias infectadas por hemoplasmas (AQUINO, 2012; HARTMANN, 2012; BIEZUS, 2017).

A replicação do vírus dentro das plaquetas frequentemente causa alterações no tamanho e formato das células, o que leva a sua perda de função e trombocitopenia acarretando quadro anêmico por hemorragias (AQUINO, 2012; HARTMANN, 2012; BIEZUS, 2017). A aplasia eritroide pura se apresenta como uma anemia severa, estando o valor de hematócrito abaixo de 15%, e com ausência de reticulócitos. Esse quadro é causado pelo FeLV-C, e segundo a literatura, ocorre em torno de 1% dos gatos virêmicos. Nesse tipo de infecção, a destruição de eritrócitos não está relacionada com destruição imunomediada, e sim por uma desregulação do exportador de heme presente nas células hematopoiéticas. A partir da interação viral, as células passam a acumular a proteína heme no seu interior, causando a apoptose celular (AQUINO, 2012; HARTMANN, 2012).

Quando observamos as alterações causadas nos linfócitos, a alteração mais comum é a linfopenia, pois devido à alta replicação viral no interior das células ocorre a destruição dos linfócitos CD4+ e CD8+ (MEXAS et al., 2008; GLEICH & HARTMANN, 2009; BIEZUS, 2017). Pancitopenias e flutuações nas contagens celulares são frequentes, às vezes com aparecimento de reticulócitos, granulócitos e plaquetas, podendo estar relacionadas com a alteração de citocinas reguladoras da hematopoiese. No entanto, a avaliação de medula óssea geralmente não mostra a presença de células precursoras (AQUINO, 2012; HARTMANN, 2012).

Gatos infectados por FeLV possuem 62% mais chances de desenvolverem neoplasias que gatos não infectados (HARTMANN, 2012). As alterações neoplásicas frequentemente relacionadas com o vírus são: a leucemia, os fibrossarcomas e as alterações mieloproliferativas ou os linfomas. Esses geralmente apresentam

predominância de células T, e se localizam no mediastino, cavidade nasal, ou região retrobulbar (AQUINO, 2012,).

Os tumores induzidos pela presença do FeLV, podem se desenvolver por diversos mecanismos. Um deles é causado pela inserção do genoma viral próximo ao *myc*, oncogene celular presente no genoma do hospedeiro, que leva a uma expressão deste gene causando uma extensa proliferação celular (HARTMANN, 2012). Outro processo de desenvolvimento tumoral relacionado ao vírus é a de mutagênese insercional, no qual o DNA viral, ao se integrar no genoma do hospedeiro, desregula as proteínas responsáveis pela sobrevivência e apoptose celular. Outras causas citadas são a liberação de citocinas pelas células infectadas, ou também o estímulo imunológico crônico (MEXAS et al., 2008; AQUINO, 2012, HARTMANN, 2012).

## **2.8 Diagnóstico**

O diagnóstico do FeLV é realizado através de testes imunocromatográficos de ensaio imunoenzimático direto (ELISA), que são os *Snap tests* realizados na clínica veterinária ou os testes de PCR. Também podem ser empregados no diagnóstico o isolamento viral (VI) e os ensaios de imunofluorescência indireto (IFA - *Immunofluorescent Antibody*) (TORRES et al., 2010). As amostras de eleição para o diagnóstico do FeLV são sangue total, plasma, soro, secreção conjuntival ou oral.

Na rotina clínica, os testes rápidos são os mais utilizados. Atualmente existem dois testes rápidos disponíveis no Brasil, um teste de imunocromatografia de fluxo bidirecional e um kit de imunocromatografia de fluxo unidirecional. Esses testes detectam a proteína p27, do capsídeo viral, e permitem a obtenção do resultado em cerca de 10 minutos. Segundo MEDEIROS et al. (2019) a sensibilidade e especificidade desses testes variam de 90,70 - 93,02% e 96,3 - 97,78%, respectivamente.

O padrão ouro em diagnóstico do FeLV é a PCR. Essa metodologia apresenta uma sensibilidade e especificidade superior aos testes rápidos (WILKES et al., 2018). Essa técnica vem sendo cada vez mais utilizada, pois, além de detectar e identificar agentes virais possibilita a caracterização genética (WESTMAN et al., 2019). Além disso, esse teste propicia a detecção do FeLV em culturas, sangue e tecidos, tanto fresco ou fixados, no decorrer de uma semana após a exposição, tempo necessário para a integração do vírus ao DNA do gato exposto (LEVY et al., 2008).

A PCR pode detectar tanto o RNA viral quanto o DNA proviral integrado ao genoma do gato infectado. Não obstante, tanto os gatos infectados na forma progressiva quanto na forma regressiva, irão abrigar o DNA proviral em seu genoma, portanto o método pode ser utilizado principalmente para detectar a presença do vírus em gatos assintomáticos que sejam candidatos a doadores de sangue (CHIU et al., 2018; WILKES et al., 2018).

## **2.9 Tratamento**

Atualmente, não existem tratamentos eficazes contra o FeLV, deste modo, o objetivo é mitigar os efeitos da doença, tratando e controlando as infecções secundárias, na tentativa de aumentar a expectativa de vida do gato infectado. Esses tratamentos frequentemente são limitados, geralmente apresentam graves efeitos colaterais e alto custo para os tutores (GREGGS et al., 2012; LUCKMAN & GATES, 2017).

A utilização de imunomoduladores, como o interferon ômega felino, tem sido estudada no tratamento do FeLV. Recentemente, um estudo foi publicado apontando os efeitos antivirais do interferon. Foi verificado que esta molécula atua na redução da atividade da transcriptase reversa, induzindo a apoptose das células infectadas pelo

FeLV (GOMEZ-LUCIA et al., 2019). Todavia, mesmo com os pacientes que passam por tratamentos sintomáticos, em sua maioria, acabam indo a óbito ou são eutanasiados dentro de dois a três anos após o diagnóstico devido às complicações clínicas da doença (LUCKMAN & GATES, 2017).

## **2.10 Controle e prevenção**

Segundo Westman et al. (2019), países desenvolvidos como Austrália e aqueles localizados na América do Norte e Europa possuem uma baixa frequência de gatos infectados, que varia entre 1-6%. Isso ocorre devido às rigorosas formas de controle instituídas nesses países, como implantação dos testes diagnósticos a todos os felinos que passam por consultas veterinárias, e protocolos de biossegurança como: vacinação, isolamento ou eutanásia dos positivos. Já nos abrigos, diretrizes aplicadas como forma de controle recomendam que todos os gatos passem por um período de quarentena de seis semanas, e após, seja realizado o teste para detecção da doença (WESTMAN et al., 2019). Em abrigos, a eutanásia de gatos FeLV positivos pode ser considerada, visto que o paciente é uma fonte de infecção e desencadeará graves doenças progressivas que o levarão ao óbito comumente dentro de 18 a 36 meses após a infecção (KRECIC et al., 2018).

O vírus da leucemia felina é o responsável por muitas mortes de gatos domésticos, no entanto, após a década de 1980, com o desenvolvimento de vacinas eficazes, essas taxas vêm diminuindo em alguns países (KRUNIC et al., 2015; CHIU et al., 2018). Atualmente, no Brasil, duas vacinas estão disponíveis contra o vírus da leucemia felina, ambas polivalentes. Essas vacinas contam com cepa inativada de FeLV.

Após a segunda vacinação, elas promovem imunidade que pode ser de um ou dois anos, dependendo da vacina utilizada.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

- Detectar e caracterizar o vírus da leucemia felina de gatos domésticos da região da Serra Gaúcha

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Detectar o FeLV por meio de teste rápido e PCR em pacientes felinos.
- Identificar os subgrupos virais do FeLV a partir de análise molecular.
- Avaliar as principais alterações hematológicas dos gatos infectados.

## **4. RESULTADOS**

### **4.1 Capítulo I**

Os dados obtidos das amostras do FeLV nesta dissertação, a metodologia utilizada e os resultados, estão descritos no capítulo a seguir, na forma de artigo científico intitulado “*Molecular characterization of feline leukemia virus from domestic cats in the Serra Gaúcha region, Rio Grande do Sul, Brazil*” que será submetido a revista *Brazilian Journal of Microbiology*. O artigo está redigido nas normas da referida revista.

## **Molecular characterization of feline leukemia virus from domestic cats in the Serra Gaúcha region, Rio Grande do Sul, Brazil**

Jéssica Martins Tadeu<sup>1</sup>, Simone Silveira<sup>2</sup>, Diéssy Kipper<sup>1</sup>, André Felipe Streck<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Diagnostic Laboratory in Veterinary Medicine, University of Caxias do Sul, Caxias do Sul-RS, Brazil.

<sup>2</sup>Laboratório de imunodiagnóstico, Universidade do Oeste de Santa Catarina, Xanxerê, SC, Brazil.

### **Abstract**

The feline leukemia virus (FeLV) belongs to the *Retroviridae* family that infects domestic and wild cats. It is associated with the occurrence of several fatal disease syndromes, including tumors, immunosuppression, hematological disorders, immune-mediated diseases and others. FeLV is classified into different subtypes (A, B, C, D and T) according to recombination events and mutations that occur mainly in the envelope (*env*) gene of the viral genome. This study aimed to carry out the molecular characterization of FeLV detected in domestic cats residing in the Serra Gaúcha region, Rio Grande do Sul, Brazil. Twenty-nine samples of cats collected in the cities of Caxias do Sul and Bento Gonçalves previously submitted to ELISA tests were included in this study. All samples passed the PCR test and were sent for genetic sequencing. Blood and tissue samples were obtained from all animals by clinical veterinarians. DNA was extracted and a partial segment of the *env* gene was amplified using a nested-PCR. Phylogenetic analyzes showed that 27 sequences clustered with other *env* sequences from FeLV-A genomes previously characterized in North America, while two sequences clustered with FeLV-B genomes. These results demonstrate the geographic restriction of FeLV genetic diversity in Brazil.

### **Introduction**

The feline leukemia virus (feline leukemia virus, FeLV) is an exogenous retrovirus, belonging to the family *Retroviridae* and to the genus *Gammaretrovirus* (Fromont et al., 1997). This virus infects domestic and wild cats (Daniels et al., 1999; Arjona et al., 2007). Progressive infection with this agent has high morbidity and mortality, and is clinically characterized by the development of multiple serious clinical syndromes, such as: tumors (lymphoma and leukemia), immunosuppression, hematological disorders (cytopenias), immune-mediated diseases and other syndromes

(including neuropathy, reproductive disorders, weakened kitten syndrome) (Dunham and Graham, 2008; Hartmann, 2012).

The FeLV is enveloped and has a single-stranded RNA genome with about 8.4 kb, composed of the *env*, *pol* and *gag* genes. The genome has a great genetic variability, which can cause structural changes in the viral envelope, associated with cell tropism (Fromont et al., 1997). Based on this genetic and phenotypic diversity, the virus is classified into five subgroups FeLV-A, FeLV-B, FeLV-C, FeLV-D, and FeLV-T (Chiu et al., 2018; Ortega et al., 2020). FeLV-A is the most frequent subgroup (Jarrett, 1999; Willett and Hosie, 2013), while FeLV-B is less common and the others subgroups are rare. FeLV-B subgroup is usually originated from the recombination of FeLV-A with an endogenous viral sequence (Polani et al., 2010) and FeLV-C subgroup are generated by the mutation of the *env* gene in the FeLV-A subgroup. Additionally, specific amino acid changes at the N-terminal end of the surface glycoprotein of the FeLV-A subgroup may result in the appearance of a viral variant called FeLV-T (Tandon et al., 2008).

FeLV infection is diagnosed by immunofluorescence assays, including antibody and direct antigen enzyme immunoassay detection (point of care). Molecular tests such as the polymerase chain reaction (PCR) are increasingly used to detect and quantify RNA or DNA viral. In addition, DNA sequencing has been used to identify FeLV subgroups and strains (Westman et al., 2019).

Previous studies demonstrated a range of 3-47% of FeLV positive cats in different Brazilian states (Jk et al., 1997; Coelho et al., 2008; Coelho et al., 2011; Lacerda et al., 2017; Biezus et al., 2019). However, FeLV infection is still underdiagnosed. There is also a lack of knowledge about the genetics of viral variants present in Brazil, specifically, in the southern region. This study aimed to genetically characterize FeLV in southern Brazil through nested-PCR followed by phylogenetic analysis.

## **Materials and Methods**

### *Sampling, collection and storage*

Blood and tissue samples were collected from 29 animals (*Felis catus domesticus*) examined in veterinary clinics in the cities of Caxias do Sul and the

University of Bento Gonçalves de Caxias do Sul, three samples from animals necropsied at the University of Caxias do Sul (RS) , Brazil) between July 2019 and August 2020 (Supplementary Table 1). All animals were crossbred, with access to the street and coexistence with other cats. In addition, they underwent veterinary medical evaluation and were tested for FeLV (immunochromatic test). None of the animals selected for the study were immunized against FeLV, and all were FIV negative. Whole blood samples were collected from all 29 animals. In addition, tumor / lymph node / and bone marrow samples were obtained from some of these animals. These samples were stored at -20°C for further molecular analysis. One gram of tissue was macerated and resuspended as a 20% (v/v) suspension in phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.2). The homogenates were clarified by centrifugation at 4000 g for 5 min and stored under refrigeration (-20 °C).

#### *DNA Extraction*

DNA was extracted of the blood and tumour tissue samples with the silica adsorption methodology using the commercial kit NewGene in accordance with the manufacturer's instruction (SimbiosBiotecnologia, Cachoeirinha, Brazil).

#### *Polymerase Chain Reaction (PCR) and Sequencing*

The total DNA of the 29 samples was used to amplify a partial sequence of the *gag* gene and the U3 region of the LTR by PCR. The primers used were Fw 5'ACAGCAGAAGTTTCAAGGCC3' and Rv 5'GACCAGTGATCAAGGGTGAG3' (Miyazawa and Jarret, 1997). All PCRs were carried out with the use of GoTaq Master Mix Kit (Promega, Brazil) in a final volume of 25 µL. The PCR conditions were as follows: an initial denaturation step at 95°C for 2 minutes, followed by 18 cycles at 95°C for 1 minute, annealing at 53°C for 1 minute, and 72°C for 2 minutes, followed by a final elongation step at 72°C for 5 minutes. Twenty-nine samples (Table 1) were selected that had better bands on the electrophoresis gel, all positive for PCR were submitted to a second PCR to amplify a 508 bp segment of the *env* gene. The PCR positive samples were submitted to a second PCR to amplify a segment of 508 bp of *env* gene. The primers were Fw 5'TAYTGGGCCTGTAACACYG3' and Rv 5'CGCTGTTTTAGTCTTTCTCTTA3' (Ramírez et al., 2016). The PCR conditions were as follows: an initial denaturation step at 94°C for 3 minutes, followed by 45

cycles at 94<sup>0</sup>C for 30 seconds, annealing at 54<sup>0</sup>C for 30 seconds, and 72<sup>0</sup>C for 30 seconds, followed by a final elongation step at 72<sup>0</sup>C for 10 minutes. PCR amplification products were purified and quantified using Gel DNA Purification Kit (MEBEB, Brazil) according to the manufacturer's instructions.

Amplicons of the 29 samples were selected and sequenced by Sanger methodology. The sequencing reaction was performed using 50-60 ng of purified amplicons, (primer concentration of 0.25 µM) and the BigDye Terminator v. 3.1 cycle sequencing kit (Thermo Fisher Scientific, USA) following manufacturing recommendations. Sequencing products were analyzed with a 3500 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific, USA). Data was collected by Data Collection v. 3.1 software (Thermo Fisher Scientific, USA).

### *Phylogenetic Analysis*

The sequence edition and assembly were performed using Geneious® v. 2020.2.4 (Biomasters, [www.geneious.com](http://www.geneious.com)), and compared with sequences deposited in the GenBank database. Sequences were aligned with the MAFFT alignment (Katoh and Standley, 2016), and phylogeny was built using the maximum likelihood (ML) method implemented in W-IQ-TREE (Trifinopoulos et al., 2016), the optimal nucleotide substitution model selected using ModelFinder (Kalyaanamoorthy et al., 2017), and 1,000 replications of the UltraFast bootstrap approximation (Hoang et al., 2018). Figtree v. 1.4.2 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>) was used to edit the phylogeny. Nucleotide sequences were submitted to the GenBank database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) under accession number MW731537-731565.

## **Results**

### *Characterization of the animals studied and PCR*

A total of 66 samples of biological material from cats treated at veterinary clinics were used in this study. All animals were positive in the Snap test as well as in the PCR. 39% (23/66) of the animals in this study were not sick, and were tested as a method of control and prevention. The 29 sequenced samples were randomly selected.

Of the 29 samples sequenced in this study, 86.2% (25/29) had clinical alterations, with apathy and anorexia being the most frequent (51.7%; 15/29), 48%

(14/29) had hematological alterations, with non-regenital anemia the most frequent (31%; 9/29). Regarding lifestyle, 27.5% (8/29) of the animals lived indoor and 62% (18/29) inside the house with access to the street (outdoor access), and 65.5% (19/29) had contact with other cats at home. Among the animals, 62% (18/29) were male, 27.5% (8/29) female and three animals sent from the necropsy department of the University of Caxias do Sul, without specified sex. The age of the studied cats ranged between 3 months and 15 years (Table 1). All samples were PCR positive.

Table 1 - Clinical and epidemiological aspects of sequenced samples

Identification	Sample	Clinical Signs	Hematological Changes	Age	Gender	Lifestyle	Other cats at home	Subgroup	
1UCS-FeLV**	Blood	Apathy, anorexia	Normal	5 years	Female	Indoor (outdoor access)	Yes	FeLV-A	
2UCS-FeLV	Blood	Apathy, anorexia	Non-regenerative anemia	5 years	Male	Indoor (outdoor access)	Yes	FeLV-A	
3UCS-FeLV	Blood	Apathy, anorexia	Non-regenerative anemia	4 years	Male	Indoor	Yes	FeLV-A	
4UCS-FeLV**	Blood	Joint dislocation	Normal	4 years	Female	Indoor (outdoor access)	Yes	FeLV-A	
5UCS-FeLV	Tumor	Necropsied feline during necropsy class, at the University of Caxias do Sul, presenting mediastinal lymphoma.							FeLV-A
6UCS-FeLV	Blood	Apathy, anorexia	Non-regenerative anemia	5 years	Male	Indoor (outdoor access)	Yes	FeLV-B	
7UCS-FeLV**	Blood	Chronic diarrhea	Normal	9 years	fêmea	Indoor (outdoor access)	Yes	FeLV-A	
8UCS-FeLV	Blood	Apathy, anorexia	Non-regenerative anemia	6 months	Male	Indoor	No	FeLV-A	
9UCS-FeLV	Blood	Anorexia	Leukocytosis	3 months	Male	Indoor	No	FeLV-A	
10UCS-FeLV	Blood	Apathy, anorexia	Anemia	5 years	Male	Indoor (outdoor access)	Yes	FeLV-A	
11UCS-FeLV	Blood	Paralysis of pelvic limbs	Normal	6 months	Female	Indoor	No	FeLV-A	
12UCS-FeLV	Blood	Apathy, anorexia	Non-regenerative anemia	2 years*	Male	Indoor (outdoor access)	Yes	FeLV-A	
13UCS-FeLV	Blood	Apathy, anorexia	Non-regenerative anemia	7 years*	Male	Indoor	No	FeLV-A	
14UCS-FeLV**	Blood	Fever, apathy	Normal	3 months	Male	Indoor (outdoor access)	Yes	FeLV-A	
15UCS-FeLV**	Blood	Dyspnoea	Normal	15 years	Female	Indoor (outdoor access)	Yes	FeLV-A	
16UCS-FeLV	Blood	Apathy, anorexia	Non-regenerative anemia	4 years	Male	Indoor	Yes	FeLV-A	
17UCS-FeLV	Blood	Linfadenomegalia	Normal	1 year	Female	Indoor	Yes	FeLV-A	
18UCS-FeLV**	Blood	Healthy	Normal	1 year	Female	Indoor (outdoor access)	No	FeLV-A	
19UCS-FeLV**	Blood	Jaundice	Anemia	5 years	Male	Indoor (outdoor access)	Yes	FeLV-A	
20UCS-FeLV	Blood	Apathy, anorexia	Normal	7 years	Male	Indoor (outdoor access)	Yes	FeLV-A	
21UCS-FeLV**	Blood	Apathy, anorexia	Normal	3 years	Male	Indoor (outdoor access)	Yes	FeLV-A	
22UCS-FeLV	Blood	Dyspnoea	Normal	12 years	Male	Indoor (outdoor access)	No	FeLV-A	
23UCS-FeLV**	Blood	Megaesophagus, megacolon	Normal	12 years	Male	Indoor (outdoor access)	Yes	FeLV-A	

24UCS-FeLV	Lymphnode	Necropsied feline during necropsy class, at the University of Caxias do Sul, presenting mediastinal lymphoma.						FeLV-A
25UCS-FeLV	Blood	Necropsied feline during necropsy class, at the University of Caxias do Sul, presenting multicentric lymphoma.						FeLV-A
26UCS-FeLV	Blood	Anorexia	Non-regenerative anemia	10 months	Male	Indoor	No	FeLV-A
27UCS-FeLV	Blood	Apathy, anorexia	Leukocytosis, anemia	12 years	Female	Indoor (outdoor access)	Yes	FeLV-A
28UCS-FeLV**	Blood	Fever, anorexia	Non-regenerative anemia	1 year	Male	Indoor (outdoor access)	Yes	FeLV-B
29UCS-FeLV	Blood	Apathy, anorexia	Leukocytosis	2 years*	Male	Indoor (outdoor access)	Yes	FeLV-A

\* Estimated age.

\*\* Cats showing signs not related to FeLV, diagnosed in screening tests.

*Phylogenetic analysis of FeLV env gene demonstrated two exogenous subgroups (A and B)*

The 29 nucleotide sequences corresponding to the *env* gene of FeLV were compared to other nine sequences *env* genes from GenBank and used to perform phylogenetic analysis (Figure 1). These sequences were: FeLV subgroup A, FeLV-FAIDS-61E (M18247), FRA (AF052723), Glasgow-1 (M12500), 3281-FeLV-A (M18248), 36TTenv-16 (FLU03162); FeLV subgroup B, RIC-FeLV-B (J03448), ST-FeLV-B (K01208), GA-FeLV-B (K01209), and E5.14-FeLV-B (AF403716). The phylogeny shows that 93.1% (27/29) of the sequences are clustered with the reference sequences of FeLV subgroup A and 6.9% (2/29) clustered with reference sequences of the FeLV subgroup B (Figure 1). Therefore, nucleotide sequences from 1UCS-FeLV, 2UCS-FeLV, 3UCS-FeLV, 4UCS-FeLV, 5UCS-FeLV, 7UCS-FeLV, 8UCS-FeLV, 9UCS-FeLV, 10UCS-FeLV, 11UCS-FeLV, 12UCS-FeLV, 13UCS-FeLV, 14UCS-FeLV, 15UCS-FeLV, 16UCS-FeLV, 17UCS-FeLV, 18UCS-FeLV, 19UCS-FeLV, 20UCS-FeLV, 21UCS-FeLV, 22UCS-FeLV, 23UCS-FeLV, 24UCS-FeLV, 25UCS-FeLV, 26UCS-FeLV, 27UCS-FeLV and 29UCS-FeLV revealed a closer relationship with the sequences FeLV-FAIDS-61E, FRA, Glasgow-1, 3281-FeLV-A and 36TTenv-16, and were classified as FeLV-A by *env* gene nucleotide sequence analyses. While 6UCS-FeLV and 28UCS-FeLV revealed a closer relationship with the sequences RIC-FeLV-B, ST-FeLV-B, GA-FeLV-B and E5.14-FeLV-B, therefore classified as FeLV-B.

Furthermore, the 29 nucleotide sequences corresponding to *env* gene of FeLV reported in this paper were compared to other 87 sequences *env* genes from GenBank previously defined as exogenous, endogenous, recombinant FeLV (Levy et al., 2008; Ramírez et al., 2016) and used to perform phylogenetic analysis. This phylogeny demonstrated that all 29 sequences are clustered with the reference sequences previously defined as exogenous FeLV (Figure 2).

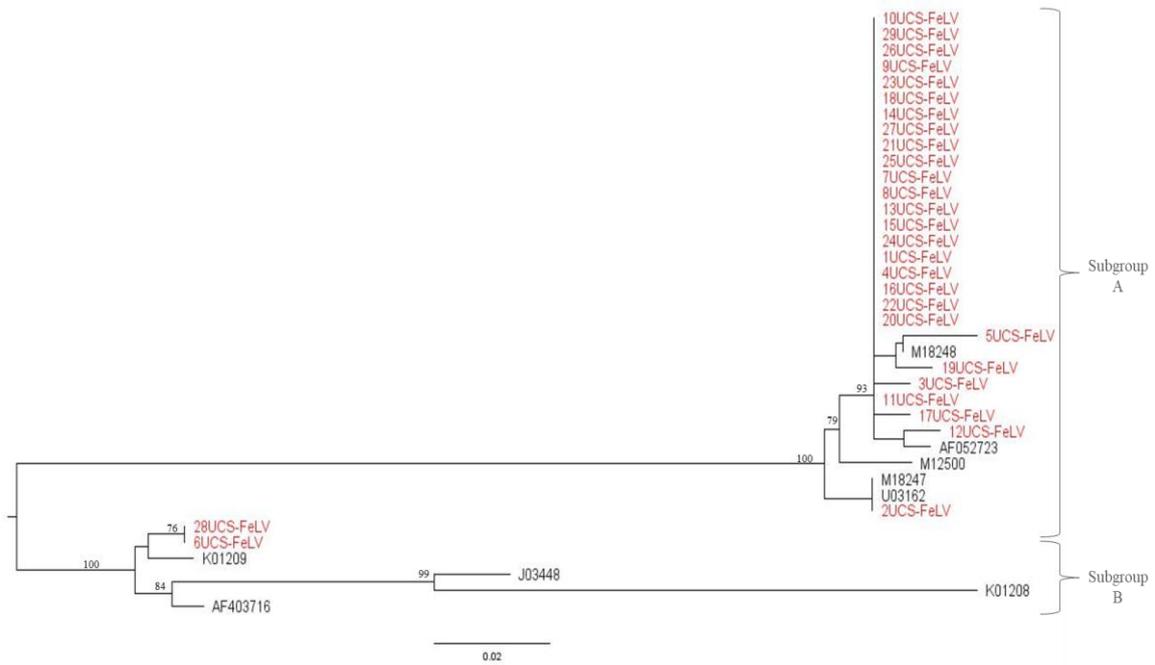


Figure 1 - Phylogenetic tree based on the *env* gene from FeLV of 29 samples sequenced in this study (red) plus nine reference sequences from GenBank (accession numbers are labeled). Braces were used to represent the FeLV subgroups A and B according to the formation of the phylogeny branches. The tree was constructed by ML method. Bootstrap values are given at the nodes of the tree and only values  $\geq 70$  are shown.

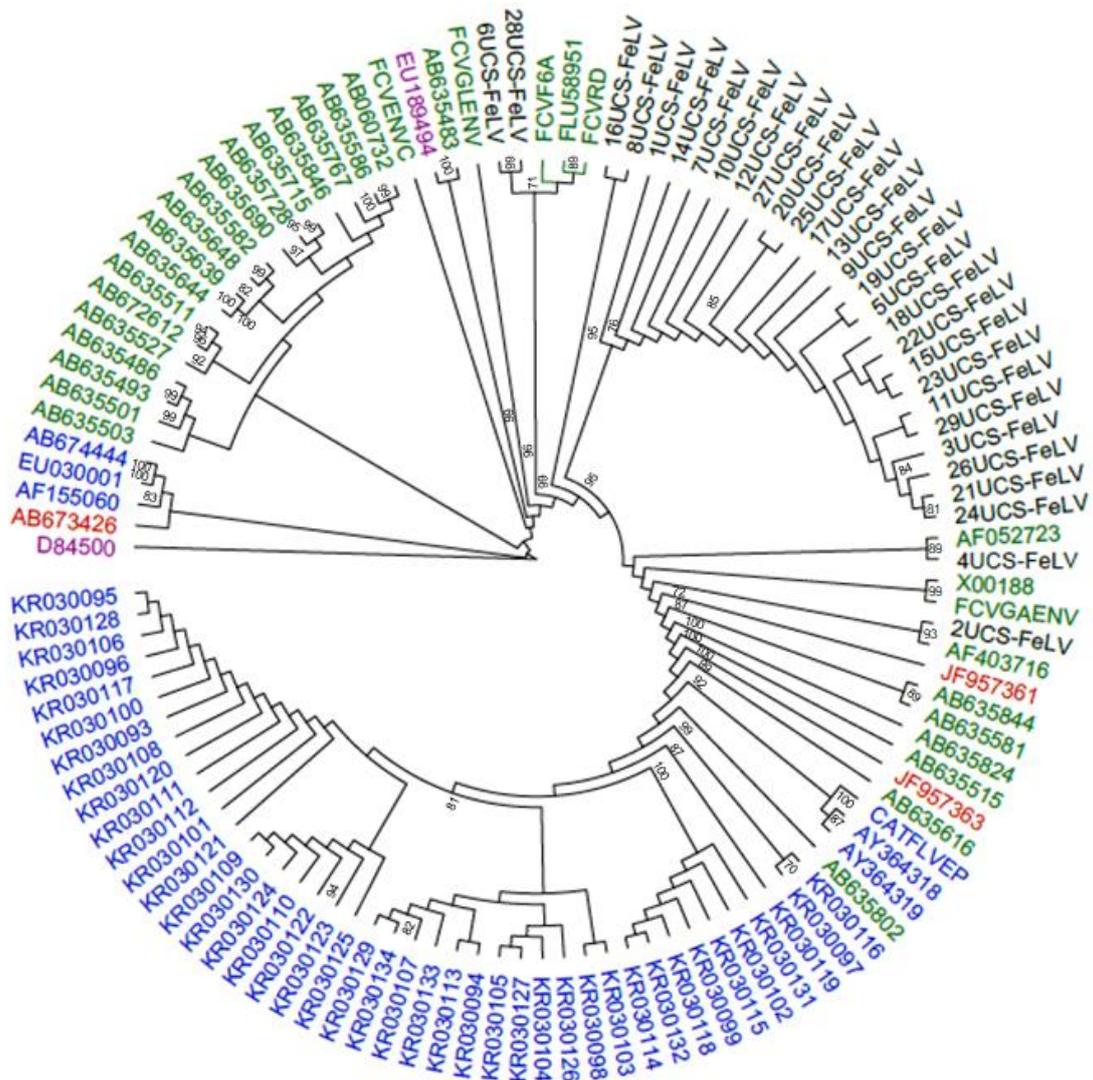


Figure 2 - Phylogenetic tree based on the *env* gene from FeLV of 29 samples sequenced in this study plus 87 reference sequences, including exogenous retrovirus (green), endogenous FeLV (blue), recombinant FeLV (red) and outgroup viruses (purple) from GenBank (accession numbers are labeled). The tree was constructed by ML method. Bootstrap values are given at the nodes of the tree and only values  $\geq 70$  are shown.

## Discussion

Studies conducted in some regions of Brazil, using different methods have reported different frequencies of positive FeLV animals, from the detection with different methods of the country. ELISA test applied to diseased cats in the São Paulo region (central-west) showed a prevalence of 10.8% of FeLV positivity (Jk et al., 1997). Nested-PCR in the Minas Gerais, revealed an infection rate of 47% in both healthy and infected animals in 2008 and 2011 (Coelho et al., 2008; Coelho et al., 2011). In the city of Cuiabá, Mato Grosso state (western region) the prevalence rate of infection was 4.5% (Poffo et al., 2017). The cities of Ilhéus and Itabuna, Bahia state (northeast region), reported prevalence rate was 3% in the nested-PCR assays for FeLV (Lacerda et al., 2017). Recently, a study produced in the southern region of Brazil (Santa Catarina state) reported the prevalence rate of 41% in diseased cats and 9.8% in healthy cats (Biezus et al., 2019).

The animals evaluated in this study showed apathy and anorexia was the most frequent clinical sign (61.5%). Anorexia is one of the main symptoms caused by FeLV infection (Kipar et al., 2001; Hartmann, 2012; Kokkinaki et al., 2021). Regarding the hematological alterations of the samples, most animals in this study had non-regenerative anemia (43%). A study by Hartmann (2012) showed that FeLV-B is mainly associated with tumors and FeLV-C is mainly associated with non-regenerative anemia, and anemia was the second most frequent change found in FeLV-infected cats (Hartmann, 2012). The majority of animals in this study (59%) were male, gender described as an important risk factor for FeLV infection in other studies (Arjona et al., 2007; Coelho et al., 2008; Gleich et al., 2009; Akhtardanesh et al., 2010; Burling et al., 2017). FeLV transmission is increased by individuals' habits, such as access to outdoors (Gleich et al., 2009). In this sense, the results of this study are very similar to another work carried out in Brazil, which observed that 67% of cats infected with FeLV have access to the outdoors (Biezus et al., 2019).

The genetic analysis revealed that 93.1% (27/29) belonged to the FeLV-A subgroup, which is the most frequent and infectious variant, although the least virulent, responsible for naturally transmission between animals (cat to cat) (Jarrett, 1999; Willett and Hosie, 2013; Coelho et al., 2008). Nevertheless, 6.9% (2/29) of the sequences were phylogenetically clustered with reference sequences from the FeLV-B

subgroup. These results are in agreement with previous studies showing that subgroup B viruses can be isolated in a smaller fraction of infected cats (Ortega et al., 2020). The FeLV-B subgroup originates from the recombination of FeLV-A and endogenous viral sequences (Polani et al., 2010), therefore, it is expected that the two subgroups could be found in our sample set. Studies show that FeLV-B viruses can be isolated from infected cats, but only in conjunction with FeLV-A, suggesting that horizontal transmission of FeLV-B is a rare event (Neil et al., 1991; Phipps et al., 2000; Coelho et al., 2008). In our study, all chromatograms of the FeLV-B sequencing had an excellent signal, not indicating amplification of another sequence in the PCR. This indicates that, if present, FeLV-A was in low viral load.

Phylogenetic analysis of the sequenced clinical samples, in our study, identified that FeLV sequences in this study correspond to a group that includes exogenous retroviruses. The sequences analyzed in this study were highly associated with geographical distribution. Other studies also observed this geographic dependent origin and/or distribution of the strains (Coelho et al., 2008, Watanabe et al., 2013).

In conclusion, a feline population in southern Brazil is mainly affected by a dominant clade formed by FeLV-A. With these results, we can verify that the genotyping of this virus is extremely important, since each subgroup can result in different clinical conditions, in addition to promoting mutations and recombinations among themselves, increasing its virulence and pathogenicity. Ongoing investigation of this virus is needed to understand its pathogenesis, which may result in effective therapies for controlling and eliminating the virus in our feline patients. More studies are located to establish new molecular tools for the diagnosis and prevalence of viruses in felines in southern Brazil, as well as to increase the understanding of the pathogenesis of this virus.

## References

- Akhtardanesh B, Ziaali N, Sharifi H, Rezaei S. Feline immunodeficiency virus, feline leukemia virus and *Toxoplasma gondii* in stray and household cats in Kerman-Iran: seroprevalence and correlation with clinical and laboratory findings. *Res Vet Sci*. 2010 Oct;89(2):306-10. doi: 10.1016/j.rvsc.2010.03.015. Epub 2010 Apr 1. PMID: 20362315.
- Arjona A, Barquero N, Doménech A, Tejerizo G, Collado VM, Toural C, Martín D, Gomez-Lucia E. Evaluation of a novel nested PCR for the routine diagnosis of feline leukemia virus (FeLV) and feline immunodeficiency virus (FIV). *J Feline Med Surg*. 2007 Feb;9(1):14-22. doi: 10.1016/j.jfms.2006.05.009. Epub 2006 Jul 24. PMID: 16863698.
- Biezus G, Machado G, Ferian PE, da Costa UM, Pereira LHHDS, Withoef J, Nunes IAC, Muller TR, de Cristo TG, Casagrande RA. Prevalence of and factors associated with feline leukemia virus (FeLV) and feline immunodeficiency virus (FIV) in cats of the state of Santa Catarina, Brazil. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2019 Apr;63:17-21. doi: 10.1016/j.cimid.2018.12.004. Epub 2018 Dec 26. PMID: 30961813.
- Burling AN, Levy JK, Scott HM, Crandall MM, Tucker SJ, Wood EG, Foster JD. Seroprevalences of feline leukemia virus and feline immunodeficiency virus infection in cats in the United States and Canada and risk factors for seropositivity. *J Am Vet Med Assoc*. 2017 Jul 15;251(2):187-194. doi: 10.2460/javma.251.2.187. PMID: 28671491.
- Chiu ES, Hoover EA, VandeWoude S. A Retrospective Examination of Feline Leukemia Subgroup Characterization: Viral Interference Assays to Deep Sequencing. *Viruses*. 2018 Jan 10;10(1):29. doi: 10.3390/v10010029. PMID: 29320424; PMCID: PMC5795442.
- Coelho FM, Bomfim MRQ, de Andrade Caxito F, Ribeiro NA, Luppi MM, Costa ÉA, Oliveira ME, Da Fonseca FG, Resende M. Naturally occurring feline leukemia virus subgroup A and B infections in urban domestic cats. *J Gen Virol*. 2008 Nov;89(Pt 11):2799-2805. doi: 10.1099/vir.0.2008/003855-0. PMID: 18931078.
- Coelho FM, Maia MQ, Luppi MM, Costa EA, Luiz APMF, Ribeiro NA, Resende M. Ocorrência do vírus da leucemia felina em *Felis catus* em Belo Horizonte. *Arq Bras Med Vet Zoot*. 2011 63(3):778-83.
- Daniels MJ, Golder MC, Jarrett O, MacDonald DW. Feline viruses in wildcats from Scotland. *J Wildl Dis*. 1999 Jan;35(1):121-4. doi: 10.7589/0090-3558-35.1.121. PMID: 10073361.
- Dunham SP, Graham E. Retroviral infections of small animals. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 2008 Jul;38(4):879-901, ix. doi: 10.1016/j.cvsm.2008.03.005. PMID: 18501285.
- Fromont E, Artois M, Langlais M, Courchamp F, Pontier D. Modelling the feline leukemia virus (FeLV) in natural populations of cats (*Felis catus*). *Theor Popul Biol*. 1997 Aug;52(1):60-70. doi: 10.1006/tpbi.1997.1320. PMID: 9345792.
- Gleich SE, Krieger S, Hartmann K. Prevalence of feline immunodeficiency virus and feline leukaemia virus among client-owned cats and risk factors for infection in Germany. *J Feline Med Surg*. 2009 Dec;11(12):985-92. doi: 10.1016/j.jfms.2009.05.019. Epub 2009 Jul 18. PMID: 19616984.

- Hartmann K. Clinical aspects of feline retroviruses: a review. *Viruses*. 2012 Oct 31;4(11):2684-710. doi: 10.3390/v4112684. PMID: 23202500; PMCID: PMC3509668.
- Heled J, Bouckaert RR. Looking for trees in the forest: summary tree from posterior samples. *BMC Evol Biol*. 2013 Oct 4;13:221. doi: 10.1186/1471-2148-13-221. PMID: 24093883; PMCID: PMC3853548.
- Hoang DT, Chernomor O, von Haeseler A, Minh BQ, Vinh LS. UFBoot2: Improving the Ultrafast Bootstrap Approximation. *Mol Biol Evol*. 2018 Feb 1;35(2):518-522. doi: 10.1093/molbev/msx281. PMID: 29077904; PMCID: PMC5850222.
- Jarrett O. Strategies of retrovirus survival in the cat. *Vet Microbiol*. 1999 Sep 1;69(1-2):99-107. doi: 10.1016/s0378-1135(99)00095-4. PMID: 10515277.
- Jk AR, Hagiwara MK, Lucas SRR. Clinical study of acquired immunodeficiency syndrome in domestic cats in São Paulo. *Braz J Vet Res Anim Sci*. 1997 34(3):152-5.
- Kalyaanamoorthy S, Minh BQ, Wong TKF, von Haeseler A, Jermini LS. ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nat Methods*. 2017 Jun;14(6):587-589. doi: 10.1038/nmeth.4285. Epub 2017 May 8. PMID: 28481363; PMCID: PMC5453245.
- Katoh K, Standley DM. A simple method to control over-alignment in the MAFFT multiple sequence alignment program. *Bioinformatics*. 2016 Jul 1;32(13):1933-42. doi: 10.1093/bioinformatics/btw108. Epub 2016 Feb 26. PMID: 27153688; PMCID: PMC4920119.
- Kipar A, Kremendahl J, Jackson ML, Reinacher M. Comparative examination of cats with feline leukemia virus-associated enteritis and other relevant forms of feline enteritis. *Vet Pathol*. 2001 Jul;38(4):359-71. doi: 10.1354/vp.38-4-359. PMID: 11467470.
- Kokkinaki KG, Saridomichelakis MN, Leontides L, Mylonakis ME, Konstantinidis AO, Steiner JM, Suchodolski JS, Xenoulis PG. A prospective epidemiological, clinical, and clinicopathologic study of feline leukemia virus and feline immunodeficiency virus infection in 435 cats from Greece. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2021 Jun 29;78:101687. doi: 10.1016/j.cimid.2021.101687. Epub ahead of print. PMID: 34225228.
- Lacerda LC, Silva AN, Freitas JS, Cruz RDS, Said RA, Munhoz AD. Feline immunodeficiency virus and feline leukemia virus: frequency and associated factors in cats in northeastern Brazil. *Genet Mol Res*. 2017 May 10;16(2). doi: 10.4238/gmr16029633. PMID: 28510253.
- Levy JK, Crawford PC, Kusuhara H, Motokawa K, Gemma T, Watanabe R, Arai S, Bienzle D, Hohdatsu T. Differentiation of feline immunodeficiency virus vaccination, infection, or vaccination and infection in cats. *J Vet Intern Med*. 2008 Mar-Apr;22(2):330-4. doi: 10.1111/j.1939-1676.2008.0078.x. PMID: 18371028.
- Miyazawa T, Jarrett O. Feline leukaemia virus proviral DNA detected by polymerase chain reaction in antigenaemic but non-viraemic ('discordant') cats. *Arch Virol*. 1997;142(2):323-32. doi: 10.1007/s007050050079. PMID: 9125046.
- Neil JC, Fulton R, Rigby M, Stewart M. Feline leukaemia virus: generation of pathogenic and oncogenic variants. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1991;171:67-93. doi: 10.1007/978-3-642-76524-7\_4. PMID: 1667630.

- Ortega C, Valencia AC, Duque-Valencia J, Ruiz-Saenz J. Prevalence and Genomic Diversity of Feline Leukemia Virus in Privately Owned and Shelter Cats in Aburrá Valley, Colombia. *Viruses*. 2020 Apr 20;12(4):464. doi: 10.3390/v12040464. PMID: 32325926; PMCID: PMC7232207.
- Phipps AJ, Hayes KA, Al-dubaib M, Roy-Burman P, Mathes LE. Inhibition of feline leukemia virus subgroup A infection by coinoculation with subgroup B. *Virology*. 2000 Nov 10;277(1):40-7. doi: 10.1006/viro.2000.0606. PMID: 11062034.
- Poffo D, Almeida AB, Nakazato L, Dutra V, Correa SH, Mendonça AJ, Sousa VR. Feline immunodeficiency virus (FIV), feline leukaemia virus (FeLV) and *Leishmania* sp. in domestic cats in the Midwest of Brazil. *Pesq Vet Bras*. 2017 37(5):491-4.
- Polani S, Roca AL, Rosensteel BB, Kolokotronis SO, Bar-Gal GK. Evolutionary dynamics of endogenous feline leukemia virus proliferation among species of the domestic cat lineage. *Virology*. 2010 Sep 30;405(2):397-407. doi: 10.1016/j.virol.2010.06.010. Epub 2010 Jul 7. PMID: 20615520.
- Ramírez H, Autran M, García MM, Carmona MÁ, Rodríguez C, Martínez HA. Genotyping of feline leukemia virus in Mexican housecats. *Arch Virol*. 2016 Apr;161(4):1039-45. doi: 10.1007/s00705-015-2740-4. Epub 2016 Jan 8. PMID: 26747244; PMCID: PMC4819734.
- Tandon R, Cattori V, Pepin AC, Riond B, Meli ML, McDonald M, Doherr MG, Lutz H, Hofmann-Lehmann R. Association between endogenous feline leukemia virus loads and exogenous feline leukemia virus infection in domestic cats. *Virus Res*. 2008 Jul;135(1):136-43. doi: 10.1016/j.virusres.2008.02.016. Epub 2008 Apr 14. PMID: 18407367.
- Trifinopoulos J, Nguyen LT, von Haeseler A, Minh BQ. W-IQ-TREE: a fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis. *Nucleic Acids Res*. 2016 Jul 8;44(W1):W232-5. doi: 10.1093/nar/gkw256. Epub 2016 Apr 15. PMID: 27084950; PMCID: PMC4987875.
- Watanabe S, Kawamura M, Odahara Y, Anai Y, Ochi H, Nakagawa S, Endo Y, Tsujimoto H, Nishigaki K. Phylogenetic and structural diversity in the feline leukemia virus env gene. *PLoS One*. 2013 Apr 11;8(4):e61009. doi: 10.1371/journal.pone.0061009. PMID: 23593376; PMCID: PMC3623909.
- Westman ME, Malik R, Norris JM. Diagnosing feline immunodeficiency virus (FIV) and feline leukaemia virus (FeLV) infection: an update for clinicians. *Aust Vet J*. 2019 Mar;97(3):47-55. doi: 10.1111/avj.12781. Erratum in: *Aust Vet J*. 2019 Sep;97(9):371. PMID: 30809813.
- Willett BJ, Hosie MJ. Feline leukaemia virus: half a century since its discovery. *Vet J*. 2013 Jan;195(1):16-23. doi: 10.1016/j.tvjl.2012.07.004. Epub 2012 Aug 3. PMID: 22867855.

## 5. DISCUSSÃO GERAL

A FeLV é uma doença de grande importância na rotina da clínica médica de felinos, pois ainda é o maior causador de síndromes clínicas, que acabam levando todos os felinos infectados ao óbito diariamente (HARTMANN, 2012; GALDO NOVO et al., 2016; CHIU et al., 2018). A forma de transmissão do FeLV através de fômites ou do *grooming*, facilita a sua disseminação, visto que ainda é um comportamento normal no Brasil a forma de criação extensiva dos gatos, e o comportamento comum a espécie de viver em colônias (WILLETT & ROSIE, 2013). Além da dificuldade de alguns tutores de manter o gato em uma criação exclusivamente *indoor*, ainda há uma resistência da maioria das pessoas que procuram clínicas veterinárias em aderir ao teste e vacinação dos seus gatos saudáveis, tanto pelo custo dos testes, bem como a primovacinação exigir duas doses, o que muitas vezes é motivo para desistência e/ou não aderência ao protocolo sanitário pelo tutor.

A patogenia da FeLV é bastante complexa quando consideradas as formas de infecção (abortiva, regressiva, progressiva), e o fato de ser um retrovírus inviabiliza as formas de tratamento, bem como dificulta muitas vezes o diagnóstico principalmente dos gatos regressores, que muitas vezes são testados quando adotados e diagnosticados como negativos nos testes rápidos e quando passam por situações de estresse e/ou imunossupressão acabam reativando o vírus e desenvolvendo alterações clínicas relacionadas com o vírus, e muitas vezes disseminando nos outros gatos negativos que compartilham o mesmo ambiente (LEVY et al., 2008; HARTMANN, 2012).

A análise filogenética do presente estudo, demonstrou que 27 amostras apresentavam FeLV-A, e apenas duas FeLV-B. Outros estudos apresentaram dados divergentes, onde FeLV-B apenas pode ser isolado juntamente com o FeLV-A (NEIL et al., 1991; PHIPPS et al., 2000; COELHO et al., 2008). A análise dos cromatogramas demonstrou que FeLV-B apresentavam excelente sinal, levantando a hipótese que o FeLV-A poderia estar com carga viral muito baixa. Outro fator que se destaca é o fato de muitos estudos apontarem o FeLV-A como o menos patogênico (Jarrett, 1999; Willett e Hosie, 2013; Coelho et al., 2008), e todas as nossas amostras sequenciadas eram de animais que se encontravam doentes ou que já tinham vindo a óbito em

decorrência da doença. Estudos também relacionam o FeLV-C com os quadros de anemia não regenerativa (principal alteração hematológica detectada nos nossos pacientes) (HARTMANN, 2012), no entanto não houveram amostras que se agrupassem as sequencias de referencia FeLV-C na nossa análise filogenética. Estes achados nos provam que ainda muitos estudos a respeito deste vírus são necessários, para que possamos relacionar os achados clínicos e hematológicos com os subgrupos identificados, visando sempre aumentar a expectativa e reduzir a sintomatologia clínica do gato doente.

Como perspectivas futuras esperamos conseguir realizar um estudo de prevalência da doença na região da serra, incluindo outras cidades, identificar os subgrupos e correlacionar com o desfecho das infecções, bem como sequenciar o genoma completo do FeLV exógeno presente na região da Serra Gaúcha.

## 6. CONCLUSÕES

- Uma alta frequência do FeLV-A foi detectada nas amostras sequenciadas deste estudo, no entanto apenas duas amostras ficaram agrupadas à sequência de referência do FeLV-B.
- Não ficou evidente a associação entre subgrupos com os sinais hematológicos.
- Este estudo evidencia a importância desta virose, comum para a rotina clínica da Região da Serra Gaúcha.

## 7. BIBLIOGRAFIA COMPLEMENTAR

- ALVES, M. C. R., CONTI, L. M. C., DONATELE, D.M., & CASTRO, L. M. Leucemia viral felina: revisão. *Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia*, Maringá, v. 9, n. 2, p. 86-100, fev. 2015.
- AQUINO, L.C. Ocorrência do vírus da leucemia felina no DF e suas alterações laboratoriais. *Dissertação (Mestrado em Saúde Animal) - Universidade de Brasília, Brasília*. 2012.
- ARJONA, A., BARQUERO, N., DOMÉNECH, A., TEJERIZO, G., COLLADO, V. M., TOURAL, C., MARTÍN, D., & GOMEZ-LUCIA, E. Evaluation of a novel nested PCR for the routine diagnosis of feline leukemia virus (FeLV) and feline immunodeficiency virus (FIV). *Journal of feline medicine and surgery*, 9(1), 14–22. 2007.
- BEALL, M. J., BUCH, J., CAHILL, R. J., CLARK, G., HANSCOM, J., ESTRADA, M., LEUTENEGGER, C. M., & CHANDRASHEKAR, R. Evaluation of a quantitative enzyme-linked immunosorbent assay for feline leukemia virus p27 antigen and comparison to proviral DNA loads by real-time polymerase chain reaction. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 67, 101348. 2019.
- BIEZUS, G. Infecção pelo vírus da Leucemia (FeLV) e Imunodeficiência (FIV) em gatos do planalto de Santa Catarina: prevalência, fatores associados, alterações clínicas e hematológicas / Giovana Biezus. - Lages, 91 p. 2017.
- BIEZUS, G., MACHADO, G., FERIAN, P. E., DA COSTA, U. M., PEREIRA, L., WITHOEFT, J. A., NUNES, I., MULLER, T. R., DE CRISTO, T. G., & CASAGRANDE, R. A. Prevalence of and factors associated with feline leukemia virus (FeLV) and feline immunodeficiency virus (FIV) in cats of the state of Santa Catarina, Brazil. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 63, 17–21. 2019.
- BOLIN, L. L., & LEVY, L. S. Viral determinants of FeLV infection and pathogenesis: lessons learned from analysis of a natural cohort. *Viruses*, 3(9), 1681–1698. 2011.
- CHIU, E. S., & VANDEWOUDE, S. Presence of Endogenous Viral Elements Negatively Correlates with Feline Leukemia Virus Susceptibility in Puma and Domestic Cat Cells. *Journal of virology*, 94(21), e01274-20. 2020.
- CHIU, E. S., HOOVER, E. A., & VANDEWOUDE, S. A Retrospective Examination of Feline Leukemia Subgroup Characterization: Viral Interference Assays to Deep Sequencing. *Viruses*, 10(1), 29. 2018.
- COELHO, F. M., BOMFIM, M., DE ANDRADE CAXITO, F., RIBEIRO, N. A., LUPPI, M. M., COSTA, É. A., OLIVEIRA, M. E., DA FONSECA, F. G., & RESENDE, M. Naturally occurring feline leukemia virus subgroup A and B infections in urban domestic cats. *The Journal of general virology*, 89(Pt 11), 2799–2805. 2008.
- COELHO, F. M., MAIA, M. Q., LUPPI, M. M., COSTA, E. A., LUIZ, A. P. M. F., RIBEIRO, N. A., & RESENDE, M. Ocorrência do vírus da leucemia felina em

Feliscattus em Belo Horizonte. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 63(3), 778-783. 2011.

COTTER S. M. Management of healthy feline leukemia virus-positive cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 199(10), 1470–1473. 1991.

DA COSTA, F. V., VALLE, S. D. F., MACHADO, G., CORBELLINI, L. G., COELHO, E. M., ROSA, R. B., & GONZÁLEZ, F. H. Hematological findings and factors associated with feline leukemia virus (FeLV) and feline immunodeficiency virus (FIV) positivity in cats from southern Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 37, 1531-1536. 2017.

DANIELS, M. J., GOLDBERGER, M. C., JARRETT, O., & MACDONALD, D. W. Feline viruses in wildcats from Scotland. *Journal of wildlife diseases*, 35(1), 121–124. 1999.

DE ALMEIDA, N. R., DANELLI, M. G., DA SILVA, L. H., HAGIWARA, M. K., & MAZUR, C. Prevalence of feline leukemia virus infection in domestic cats in Rio de Janeiro. *Journal of feline medicine and surgery*, 14(8), 583–586. 2012.

ERBECK, K., GAGNE, R. B., KRABERGER, S., CHIU, E. S., ROELKE-PARKER, M., & VANDEWOUDE, S. Feline Leukemia Virus (FeLV) Endogenous and Exogenous Recombination Events Result in Multiple FeLV-B Subtypes during Natural Infection. *Journal of virology*, 95(18), e0035321. 2021.

LEITE FILHO, R. V. Aspectos epidemiológicos, patológicos e imuno-histoquímicos de linfoma em felinos no sul do Brasil. 2018.

FILONI, C., HELFER-HUNGERBUEHLER, A. K., CATÃO-DIAS, J. L., MARQUES, M. C., TORRES, L. N., REINACHER, M., & HOFMANN-LEHMANN, R. Putative progressive and abortive feline leukemia virus infection outcomes in captive jaguarundis (*Puma yagouaroundi*). *Virology journal*, 14(1), 226. 2017.

FROMONT, E., SAGER, A., LÉGER, F., BOURGUÉMESTRE, F., JOUQUELET, E., STAHL, P., PONTIER, D., & ARTOIS, M. Prevalence and pathogenicity of retroviruses in wildcats in France. *The Veterinary record*, 146(11), 317–319. 2000.

GALDO NOVO, S., BUCAFUSCO, D., DIAZ, L. M., & BRATANICH, A. C. Viral diagnostic criteria for Feline immunodeficiency virus and Feline leukemia virus infections in domestic cats from Buenos Aires, Argentina. *Revista Argentina de microbiologia*, 48(4), 293–297. 2016.

GATES, M. C., VIGEANT, S., & DALE, A. Prevalence and risk factors for cats testing positive for feline immunodeficiency virus and feline leukaemia virus infection in cats entering an animal shelter in New Zealand. *New Zealand veterinary journal*, 65(6), 285–291. 2017.

GLEICH, S. E., KRIEGER, S., & HARTMANN, K. Prevalence of feline immunodeficiency virus and feline leukaemia virus among client-owned cats and risk factors for infection in Germany. *Journal of feline medicine and surgery*, 11(12), 985–992. 2009.

GLEICH, S., & HARTMANN, K. Hematology and serum biochemistry of feline immunodeficiency virus-infected and feline leukemia virus-infected cats. *Journal of veterinary internal medicine*, 23(3), 552–558. 2009.

- GOMEZ-LUCIA, E., COLLADO, V. M., MIRÓ, G., MARTÍN, S., BENÍTEZ, L., & DOMÉNECH, A. Follow-Up of Viral Parameters in FeLV- or FIV-Naturally Infected Cats Treated Orally with Low Doses of Human Interferon Alpha. *Viruses*, *11*(9), 845. 2019.
- GREGGS, W. M., CLOUSER, C. L., PATTERSON, S. E., & MANSKY, L. M. Discovery of drugs that possess activity against feline leukemia virus. *The Journal of general virology*, *93*(Pt 4), 900–905. 2012.
- HAGIWARA, M. K., JÚNIOR, A. R., & LUCAS, S. R. R. Estudo clínico da infecção de felinos pelo vírus da leucemia felina em São Paulo. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, *4*(1). 1997.
- HARTMANN K. Clinical aspects of feline retroviruses: a review. *Viruses*, *4*(11), 2684–2710. 2012.
- HARTMANN, K., & HOFMANN-LEHMANN, R. What's New in Feline Leukemia Virus Infection. *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice*, *50*(5), 1013–1036. 2020.
- HOFMANN-LEHMANN, R., HUDER, J. B., GRUBER, S., BORETTI, F., SIGRIST, B., & LUTZ, H. Feline leukaemia provirus load during the course of experimental infection and in naturally infected cats. *The Journal of general virology*, *82*(Pt 7), 1589–1596. 2001.
- JARRETT O. Strategies of retrovirus survival in the cat. *Veterinary microbiology*, *69*(1-2), 99–107. 1999.
- KRECIC, M. R., VELINENI, S., MEEUS, P., FAN, H., & LOENSER, M. Diagnostic performances of two rapid tests for detection of feline leukemia virus antigen in sera of experimentally feline leukemia virus-infected cats. *JFMS open reports*, *4*(1), 2055116917748117. 2018.
- KRUNIC, M., ERTL, R., HAGEN, B., SEDLAZECK, F. J., HOFMANN-LEHMANN, R., VON HAESLER, A., & KLEIN, D. Decreased expression of endogenous feline leukemia virus in cat lymphomas: a case control study. *BMC veterinary research*, *11*, 90. 2015.
- LACERDA, L. C., SILVA, A. N., FREITAS, J. S., CRUZ, R., SAID, R. A., & MUNHOZ, A. D. Feline immunodeficiency virus and feline leukemia virus: frequency and associated factors in cats in northeastern Brazil. *Genetics and molecular research: GMR*, *16*(2), 10.4238/gmr16029633. 2017.
- LEMOIS, M., OLIVEIRA, J. S., ALMEIDA, S. J., DE OLIVEIRA, P. G., FERRAZ, H. T., LOPES, D. T., & BRAGA, Í. A. Ocorrência da leucemia felina e imunodeficiência felina em gatos domésticos do município de Mineiros, Goiás. *Pubvet*, *13*, 148. 2019.
- LEVY, J., CRAWFORD, C., HARTMANN, K., HOFMANN-LEHMANN, R., LITTLE, S., SUNDAHL, E., & THAYER, V. 2008 American Association of Feline Practitioners' feline retrovirus management guidelines. *Journal of feline medicine and surgery*, *10*(3), 300–316. 2008.
- LEVY, J., RICHARDS, J., EDWARDS, D., ELSTON, T., HARTMANN, K., RODAN, I., THAYER, V., TOMPKINS, M., WOLF, A., AMERICAN ASSOCIATION OF FELINE PRACTITIONERS, & ACADEMY OF FELINE MEDICINE ADVISORY PANEL. 2001 Report of the American Association of Feline Practitioners and Academy

- of Feline Medicine Advisory Panel on feline retrovirus testing and management. *Journal of feline medicine and surgery*, 5(1), 3–10. 2003.
- LUCKMAN, C., & GATES, M. C. Epidemiology and clinical outcomes of feline immunodeficiency virus and feline leukaemia virus in client-owned cats in New Zealand. *JFMS open reports*, 3(2), 2055116917729311. 2017.
- MAJOR, A., CATTORI, V., BOENZLI, E., RIOND, B., OSSENT, P., MELI, M. L., HOFMANN-LEHMANN, R., & LUTZ, H. Exposure of cats to low doses of FeLV: seroconversion as the sole parameter of infection. *Veterinary research*, 41(2), 17. 2010.
- MARUYAMA, S., KABEYA, H., NAKAO, R., TANAKA, S., SAKAI, T., XUAN, X., KATSUBE, Y., & MIKAMI, T. Seroprevalence of Bartonella henselae, Toxoplasma gondii, FIV and FeLV infections in domestic cats in Japan. *Microbiology and immunology*, 47(2), 147–153. 2003.
- MEDEIROS, S. O., SILVA, B. J. A., CARNEIRO, A. L., FERREIRA JÚNIOR, O. C., & TANURI, A. Avaliação de dois testes sorológicos comerciais para diagnóstico das infecções pelo FIV e pelo FeLV. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 71(2), 447-454. Epub June 06. 2019.
- MEXAS, A. M., FOGLE, J. E., TOMPKINS, W. A., & TOMPKINS, M. B. CD4+CD25+ regulatory T cells are infected and activated during acute FIV infection. *Veterinary immunology and immunopathology*, 126(3-4), 263–272. 2008.
- MIYAKE, A., KAWASAKI, J., NGO, H., MAKUNDI, I., MUTO, Y., KHAN, A. H., SMITH, D. J., & NISHIGAKI, K. Reduced Folate Carrier: an Entry Receptor for a Novel Feline Leukemia Virus Variant. *Journal of virology*, 93(13), e00269-19. 2019.
- MIYAKE, A., WATANABE, S., HIRATSUKA, T., ITO, J., NGO, M. H., MAKUNDI, I., KAWASAKI, J., ENDO, Y., TSUJIMOTO, H., & NISHIGAKI, K. Novel Feline Leukemia Virus Interference Group Based on the env Gene. *Journal of virology*, 90(9), 4832–4837. 2016.
- MORA, M., NAPOLITANO, C., ORTEGA, R., POULIN, E., & PIZARRO-LUCERO, J. Feline immunodeficiency virus and feline leukemia virus infection in free-ranging guignas (Leopardus guigna) and sympatric domestic cats in human perturbed landscapes on Chiloé Island, Chile. *Journal of wildlife diseases*, 51(1), 199–208. 2015.
- NESINA, S., KATRIN HELFER-HUNGERBUEHLER, A., RIOND, B., BORETTI, F. S., WILLI, B., MELI, M. L., GREY, P., & HOFMANN-LEHMANN, R. Retroviral DNA--the silent winner: blood transfusion containing latent feline leukemia provirus causes infection and disease in naïve recipient cats. *Retrovirology*, 12, 105. 2015.
- NORRIS, J. M., BELL, E. T., HALES, L., TORIBIO, J. A., WHITE, J. D., WIGNEY, D. I., BARAL, R. M., & MALIK, R. Prevalence of feline immunodeficiency virus infection in domesticated and feral cats in eastern Australia. *Journal of feline medicine and surgery*, 9(4), 300–308. 2007.
- ORTEGA, C., VALENCIA, A. C., DUQUE-VALENCIA, J., & RUIZ-SAENZ, J. Prevalence and Genomic Diversity of Feline Leukemia Virus in Privately Owned and Shelter Cats in Aburrá Valley, Colombia. *Viruses*, 12(4), 464. 2020.
- POFFO, D., ALMEIDA, A. B., NAKAZATO, L., DUTRA, V., CORREA, S. H., MENDONÇA, A. J., & SOUSA, V. R. Feline immunodeficiency virus (FIV), feline

- leukaemia virus (FeLV) and *Leishmania* sp. in domestic cats in the Midwest of Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 37(5), 491-494. 2017.
- POLANI, S., ROCA, A. L., ROSENSTEEL, B. B., KOLOKOTRONIS, S. O., & BARGAL, G. K. Evolutionary dynamics of endogenous feline leukemia virus proliferation among species of the domestic cat lineage. *Virology*, 405(2), 397–407. 2010.
- POWERS, J. A., CHIU, E. S., KRABERGER, S. J., ROELKE-PARKER, M., LOWERY, I., ERBECK, K., TROYER, R., CARVER, S., & VANDEWOUDE, S. Feline Leukemia Virus (FeLV) Disease Outcomes in a Domestic Cat Breeding Colony: Relationship to Endogenous FeLV and Other Chronic Viral Infections. *Journal of virology*, 92(18), e00649-18. 2018.
- RAMÍREZ, H., AUTRAN, M., GARCÍA, M. M., CARMONA, M. Á., RODRÍGUEZ, C., & MARTÍNEZ, H. A. Genotyping of feline leukemia virus in Mexican housecats. *Archives of virology*, 161(4), 1039–1045. 2016.
- ROSADO, R. C. Rastreo Viroológico de Carnívoros errantes e caracterização genética viral, *Universidade Técnica de Lisboa*. 2009.
- SILVA, C. P., ONUMA, S. S., DE AGUIAR, D. M., DUTRA, V., & NAKAZATO, L. Molecular detection of Feline Leukemia Virus in free-ranging jaguars (*Panthera onca*) in the Pantanal region of Mato Grosso, Brazil. *The Brazilian journal of infectious diseases: an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases*, 20(3), 316–317. 2016.
- SOUZA, H. J. M., & TEIXEIRA, C. H. R. *Medicina e Cirurgia Felina*. 1ª ed. Rio de Janeiro: Ed. Lf Livros, 475p. 2003.
- STEWART, M. A., WARNOCK, M., WHEELER, A., WILKIE, N., MULLINS, J. I., ONIONS, D. E., & NEIL, J. C. Nucleotide sequences of a feline leukemia virus subgroup A envelope gene and long terminal repeat and evidence for the recombinational origin of subgroup B viruses. *Journal of virology*, 58(3), 825–834. 1986.
- SYKES, J. E., & HARTMANN, K. Feline Leukemia Virus Infection. *Canine and Feline Infectious Diseases*, 224–238. 2014.
- TORRES, A. N., MATHIASON, C. K., & HOOVER, E. A. Re-examination of feline leukemia virus: host relationships using real-time PCR. *Virology*, 332(1), 272–283. 2005.
- TORRES, A. N., O'HALLORAN, K. P., LARSON, L. J., SCHULTZ, R. D., & HOOVER, E. A. Feline leukemia virus immunity induced by whole inactivated virus vaccination. *Veterinary immunology and immunopathology*, 134(1-2), 122–131. 2010.
- TURRAS, M. C. C. D. Estudo da prevalência de FIV/FeLV numa população de 88 gatos errantes da região metropolitana de Lisboa. Dissertação de Mestrado. 2014.
- VICTOR, R. M. Diagnóstico molecular da Leucemia viral felina por meio da utilização de Swab Oral, conjuntival e retal. 2019.
- WATANABE, S., KAWAMURA, M., ODAHARA, Y., ANAI, Y., OCHI, H., NAKAGAWA, S., ENDO, Y., TSUJIMOTO, H., & NISHIGAKI, K. Phylogenetic and structural diversity in the feline leukemia virus env gene. *PloS one*, 8(4), e61009. 2013.

WESTMAN, M., NORRIS, J., MALIK, R., HOFMANN-LEHMANN, R., HARVEY, A., MCLUCKIE, A., PERKINS, M., SCHOFIELD, D., MARCUS, A., MCDONALD, M., WARD, M., HALL, E., SHEEHY, P., & HOSIE, M. The Diagnosis of Feline Leukaemia Virus (FeLV) Infection in Owned and Group-Housed Rescue Cats in Australia. *Viruses*, 11(6), 503. 2019.

WILKES, R. P., ANIS, E., DUNBAR, D., LEE, P. A., TSAI, Y. L., LEE, F. C., CHANG, H. G., WANG, H. T., & GRAHAM, E. M. Rapid and sensitive insulated isothermal PCR for point-of-need feline leukaemia virus detection. *Journal of feline medicine and surgery*, 20(4), 362–369. 2018.

WILLETT, B. J., & HOSIE, M. J. Feline leukaemia virus: half a century since its discovery. *Veterinary journal (London, England: 1997)*, 195(1), 16–23. 2013.

LITTLE, S., LEVY, J. HARTMANN, K. HOFMANN-LEHMANN, R., HOSIE, M., OLAH, G. DENIS, K. Feline retrovirus Testing and Management Guidelines. *Journals of Felne Medicine and Surgery*, 22, 5-30. 2020.