



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

**ANÁLISES DE DIVERSIDADE GENÉTICA E PADRONIZAÇÃO DE DIAGNÓSTICO
MOLECULAR PARA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE RETROVÍRUS FELINOS**

Diezza Biondo

CAXIAS DO SUL

2022

Diezza Biondo

**ANÁLISES DE DIVERSIDADE GENÉTICA E PADRONIZAÇÃO DE DIAGNÓSTICO
MOLECULAR PARA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE RETROVÍRUS FELINOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, como parte dos requisitos para a obtenção de grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Dr. Vagner Ricardo Lunge

Co-orientador: Dr. André Felipe Streck

CAXIAS DO SUL

2022

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

B615a Biondo, Diezza

Análises de diversidade genética e padronização de diagnóstico molecular para detecção e quantificação de retrovírus felinos [recurso eletrônico] / Diezza Biondo. – 2022.

Dados eletrônicos.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2022.

Orientação: Vagner Ricardo Lunge.

Modo de acesso: World Wide Web

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

1. Vírus da Imunodeficiência Felina. 2. Vírus da leucemia felina. 3. Reação em cadeia de polimerase. 4. Filogenia. 5. Gatos - Infecções. I. Lunge, Vagner Ricardo, orient. II. Título.

CDU 2. ed.: 578.828:636.8

Catalogação na fonte elaborada pela(o) bibliotecária(o)
Márcia Servi Gonçalves - CRB 10/1500

**Análises de diversidade genética e padronização de diagnóstico molecular para detecção e
quantificação de retrovírus felinos**

Diezza Biondo

Dissertação submetida a banca examinadora designada pela coordenação do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, como parte dos requisitos para a obtenção de grau de Mestre em Biotecnologia.

Aprovada em 13 de dezembro de 2022

Banca Examinadora

Orientador: Prof. Dr. Vagner Ricardo Lunge
Universidade de Caxias do Sul

Co-orientador: Prof. Dr. André Felipe Streck
Universidade de Caxias do Sul

Profa. Dra. Suelen Osmarina Paesi
Universidade de Caxias do Sul

Profa. Dra. Antonella Souza Mattei
Universidade de Caxias do Sul

Profa. Dra. Lauren Santos Mello
Simbios Biotecnologia

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente à Deus, pela dádiva da vida e por me permitir realizar tantos sonhos nesta existência.

Aos meus pais, pelo apoio, incentivo e por não medirem esforços para a concretização dos meus sonhos.

Agradeço ao meu namorado, Guilherme, por sempre me apoiar incondicionalmente, me incentivar e acreditar no meu potencial, quando muitas vezes eu mesma duvidei.

Agradeço aos meus colegas e amigos de jornada científica: Jéssica, Weslei, Diéssy, Muriel e Sabrina, que de forma direta ou indireta contribuíram e auxiliaram na elaboração deste estudo e cujo apoio e amizade estiveram presentes em todos os momentos. Em especial à Jéssica, Weslei e Diéssy, sem o suporte, incentivo e empenho de vocês, este trabalho jamais teria sido possível.

Agradeço imensamente ao meu orientador, Vagner, pela oportunidade, suporte e dedicação para desenvolvimento deste estudo. Agradeço à CAPES, à Universidade de Caxias do Sul e ao Instituto de Biotecnologia pelo espaço e estrutura disponíveis para realização deste trabalho.

Dedico este trabalho à todas as mulheres que batalham diariamente para conquistar seu espaço na ciência e serem adequadamente reconhecidas.

“O Homem é parte da natureza e a sua guerra contra a natureza é, inevitavelmente, uma guerra contra a si mesmo.”

Rachel Carson

SUMÁRIO

Resumo.....	12
Abstract	13
1. Introdução	14
2. Revisão de literatura.....	16
2.1. Vírus da imunodeficiência felina (FIV)	16
2.1.1. Transmissão e manifestações clínicas	18
2.1.2. Epidemiologia	20
2.1.3. Diagnóstico	21
2.2. Vírus de leucemia felina (FeLV)	23
2.2.1. Transmissão e manifestações clínicas	26
2.2.2. Epidemiologia	28
2.2.3. Diagnóstico	29
3. Objetivos	32
3.1. Objetivo geral.....	32
3.2. Objetivos específicos	32
4. Resultados	33
CAPÍTULO I: Manuscrito “ <i>Feline immunodeficiency virus</i> phylogenetic classification”	33
CAPÍTULO II: Manuscrito “Quantitative polymerase chain reaction assays for detection and viral load determination of feline retroviruses in domestic cats from South Brazil”	51
5. Discussão geral	67
6. Conclusão e Perspectivas	71
7. Referências	72
ANEXOS	90
ANEXO I: Formulário e termo de autorização de coleta.....	90
ANEXO II: Materiais Suplementares dos artigos.....	91

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

% – Porcento

< – Menor

> – Maior

°C – Graus Celsius

CA – Capsídeo

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

DNA – Ácido desoxiribonucleico

DU – dUTPase

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA – Ensaio de Imunoabsorção Enzimática

EnFeLV – Vírus da Leucemia Felina endógena

env – Gene associado ao Envelope

ExFeLV – Vírus da Leucemia Felina exógena

FAIDS – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida Felina

Fca – FIV circulante em gatos domésticos (*Felis catus*)

FeLV – Vírus da Leucemia Felina

FIV – Vírus da Imunodeficiência Felina

g – Grama

gag – Gene associado ao Antígeno Específico de Grupo (*Group AntiGen*)

h – Hora

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana

IC – Intervalo de confiança

IFA – Imunofluorescência Direta

IN – Integrase

LTR – Regiões de Repetição Terminal Longa

MA – Matriz

Min – Minuto

ml – Mililitro

NC – Nucleocapsídeo

NCBI – Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia

nm – Nanômetro

nPCR – Nested PCR - Reação em Cadeia da Polimerase Aninhada

ORF-A – Quadro de Leitura Aberto A

pb – Pares de base

PCR – Reação em Cadeia pela Polimerase

pol – Gene associado a Polimerase

PR – Protease

qPCR – Reação em Cadeia pela Polimerase Quantitativa em Tempo Real

rev – Gene acessório que articula o início da transcrição do RNA viral

RNA – Ácido ribonucleico

RS – Rio Grande do Sul

RT – Transcriptase Reversa

RT-PCR – Reação em Cadeia pela Polimerase pela Transcriptase Reversa

RT-qPCR – Reação em Cadeia pela Polimerase pela Transcriptase Reversa em Tempo Real

ssRNA – Vírus de RNA de fita simples de sentido positivo

SU – Superfície

TM – Transmembrana

u – Unidade

UCS – Universidade de Caxias do Sul

vif – Gene acessório responsável pela replicação viral

μL – Microlitro

LISTA DE TABELAS

Tabela do capítulo II:

Table 1 – Comparative analysis of qPCR and IC rapid tests.	58
--	----

LISTA DE FIGURAS

Figuras da dissertação:

Figura 1 – Esquema do ciclo de replicação do vírus da imunodeficiência felina (FIV).....	16
Figura 2 – Estrutura genômica do FIV.....	17
Figura 3 – Distribuição geográfica mundial dos subtipos A, B, C, D, E, F e U-Zenv de FIV	21
Figura 4 – Esquema do ciclo biológico do FeLV	23
Figura 5 – Estrutura genômica do FeLV.....	24
Figura 6 – Estruturas genômicas dos subtipos de FeLV descritas até o momento	26

Figuras do capítulo I:

Figure 1 – Shows the main recombination site in wild-host sequences of the WGS dataset	48
Figure 2 – Shows the main recombinant sites between subtypes B, D and E of the <i>env</i> dataset.....	48
Figure 3 – Phylogenetic tree based on 41 WGS	49
Figure 4 – Phylogenetic tree based on 73 <i>env</i> gene sequences.....	50

Figuras do capítulo II:

Figure 1A - Viral load (log ₁₀) mean of the FIV positive samples RT-PCR	59
Figure 1B – Viral load (log ₁₀) mean of the FeLV positive samples RT-PCR.....	60

Resumo

O vírus da imunodeficiência felina (FIV) e o vírus da leucemia felina (FeLV) pertencem à família *Retroviridae* e consistem dos agentes etiológicos de duas doenças infecciosas com elevada prevalência e que acometem os felinos domésticos e silvestres no mundo todo. A infecção pelo FIV resulta na síndrome da imunodeficiência adquirida dos felinos, o que leva a infecções oportunistas, doenças neurológicas e tumores. A infecção pelo FeLV também leva a uma supressão da atividade do sistema imune, e desenvolvimento de linfomas, infecções secundárias e redução drástica da expectativa de vida dos felinos. Ambos os vírus apresentam elevada diversidade genética devido a eventos de recombinação (entre diferentes vírus e com sequências felinas endógenas) e mutação. O diagnóstico das infecções na rotina clínica é realizado por meio de testes rápidos (imunocromatográficos) e moleculares (principalmente a PCR, *polymerase chain reaction*). A PCR é a principal técnica utilizada para detecção e quantificação desses vírus. O presente estudo teve como objetivos analisar a diversidade genética de FIV e FeLV com amostras provenientes do Genbank e padronizar métodos de PCR para a detecção e quantificação de FIV e FeLV de amostras provenientes de Caxias do Sul/RS. A análise da diversidade genética de FIV e FeLV foi realizada a partir de sequências depositadas em bancos de dados genéticos. A padronização de ensaios de PCR para detecção e quantificação de FIV e FeLV foi realizada com o estabelecimento dos métodos no laboratório e análise de amostras de sangue oriundo de punção da jugular de gatos domésticos, previamente avaliados com testes rápidos (imunocromatográficos). Os resultados obtidos demonstraram uma correlação positiva entre os testes. O ensaio de PCR para detecção de FIV apresentou sensibilidade de 83%, especificidade de 96% e valor Kappa de 0,7. No caso do FeLV, o ensaio de PCR apresentou sensibilidade de 69%, especificidade de 80% e valor Kappa de 0,4. Além disso, os ensaios possibilitaram a determinação de cargas virais baixas e altas, com Cts variando entre 25,3-37,4 para FIV e entre 13,4-37,8 para FeLV. Os resultados foram consistentes para FIV, com a demonstração de eventos de recombinação na evolução desse vírus e a existência de seis linhagens diferentes, disseminadas mundialmente. Por outro lado, não foi possível analisar a diversidade de FeLV, devido à excessiva quantidade de eventos de recombinação nas sequências depositadas. Esses resultados reforçam a importância da realização de estudos filogenéticos para determinar a diversidade desses vírus e da necessidade da padronização e validação de métodos de Biologia Molecular para o diagnóstico de retrovírus felinos.

Palavras-chave: FIV, FeLV, *in silico*, PCR, análises filogenéticas.

Abstract

Feline immunodeficiency virus (FIV) and Feline leukemia virus (FeLV) belong to the *Retroviridae* family and are the etiological agents of two highly prevalent infectious diseases that affect domestic and wild cats worldwide. FIV infection results in feline acquired immunodeficiency syndrome, which leads to opportunistic infections, neurological diseases and tumors. FeLV infection also leads to a suppression of the activity of the immune system, and the development of lymphomas, secondary infections and a drastic reduction in the life expectancy of cats. Both viruses show high genetic diversity due to recombination events (between different viruses and with endogenous feline sequences) and mutation. The diagnosis of infections in the clinical routine is performed using rapid (immunochromatographic) and molecular tests (mainly PCR, polymerase chain reaction). PCR is the main technique used to detect and quantify these viruses. The present study aimed to analyze the genetic diversity of FIV and FeLV with samples from Genbank and to standardize PCR methods for the detection and quantification of FIV and FeLV in samples from Caxias do Sul/RS. The analysis of the genetic diversity of FIV and FeLV was carried out from sequences deposited in genetic databases. The standardization of PCR assays for the detection and quantification of FIV and FeLV was carried out with the establishment of methods in the laboratory and analysis of blood samples from jugular puncture of domestic cats, previously evaluated with rapid tests (immunochromatographic). The results obtained showed a positive correlation between the tests. The PCR assay for FIV detection showed a sensitivity of 83%, specificity of 96% and a Kappa value of 0.7. In the case of FeLV, the PCR test showed a sensitivity of 69%, a specificity of 80% and a Kappa value of 0.4. In addition, the assays enabled the determination of low and high viral loads, with Cts ranging from 25.3-37.4 for FIV and between 13.4-37.8 for FeLV. The results were consistent for FIV, with the demonstration of recombination events in the evolution of this virus and the existence of six different lineages, disseminated worldwide. On the other hand, it was not possible to analyze FeLV diversity, due to the excessive amount of recombination events in the deposited sequences. These results reinforce the importance of carrying out phylogenetic studies to determine the diversity of these viruses and the need for standardization and validation of Molecular Biology methods for the diagnosis of feline retroviruses.

Keywords: FIV, FeLV, *in silico*, PCR, phylogenetic analysis

1. Introdução

Os gatos domésticos (*Felis catus*) são originados evolutivamente do gato selvagem norte-africano (*Felis silvestris lybica*). A domesticação ocorreu há mais de 9.000 anos (SERPELL, 2000; BELLWOOD, 2005; BRADSHAW, 2006; NGO et al., 2019). Conforme os seres humanos mudaram para um estilo de vida mais sedentário, os depósitos de alimento começaram a atrair camundongos e ratos (BONHOMME, 1978). A partir disso, os gatos selvagens começaram a conviver com humanos para obtenção de alimento fácil, e os homens passaram a aceitar esses animais devido a serventia no controle de pragas (LITTLE, 2016).

Os gatos são muito ágeis, independentes e solitários. E estão ganhando cada vez mais espaço e popularidade como animais de companhia devido à fácil adaptação ao estilo de vida moderno (SERPELL, 2000; BROOM, FRASER, 2010; LITTLE, 2016). No Brasil, a população de felinos é constituída em torno de 27,1 milhões de animais, com um crescimento acumulado de 5,9% entre 2020/2021, conforme a Associação Nacional dos Fabricantes de Alimentos para PETs (ANFAL PET, 2021).

O gato doméstico é acometido por várias doenças infecciosas, o que pode representar uma preocupação para a saúde dos próprios animais e do homem. As doenças infecciosas virais têm características bastante próprias, incluindo padrões de evolução, virulência e patogenicidade que afetam diretamente na transmissão, disseminação e patogênese (O'BRIEN et al., 2012). As doenças causadas por retrovírus são conhecidas há muitos anos, ocorrendo com elevada frequência, alta letalidade e disseminadas mundialmente (SOUZA, TEIXEIRA, 2003).

A família *Retroviridae* pertence à ordem *Ortervirales* e apresenta dois agentes infecciosos principais: vírus da imunodeficiência felina (FIV, *feline immunodeficiency virus*) e vírus da leucemia felina (FeLV, *feline leukemia virus*) (KRUPOVIC et al., 2018; COFFIN et al., 2021). Esses retrovírus apresentam diversos tipos, com características genéticas próprias e diferentes capacidades de causar doenças (LEVY et al., 2008; HARTMANN, 2011). A diversidade genética do FIV ocorre devido a eventos de recombinação e mutação, principalmente no gene *env* (HAYWARD, RODRIGO, 2008). A recombinação ocorre com a infecção celular simultânea por mais de um subtipo (GOFF, 2001; REGGETI, BIENZLE, 2004). Já a variação genética no FeLV é estabelecida durante a sua replicação por recombinação com sequências endógenas e mutações devido a erros da transcriptase reversa (OVERBAUGH, BANGHAM, 2001). Essa recombinação constante de vírus endógenos e exógenos possibilitou o surgimento de ampla diversidade de variantes (ERBECK et al., 2021; CANO-ORTIZ et al., 2022).

O diagnóstico das infecções pelo FIV e FeLV é usualmente realizado pelo exame clínico e observação de sinais bastante variados e inespecíficos nos animais infectados. A confirmação diagnóstica com o uso de testes imunológicos e/ou moleculares para a detecção específica de FIV e FeLV tem sido cada vez mais recomendada nas rotinas de medicina felina. Os métodos de diagnóstico incluem os imunocromatográficos (conhecidos como testes rápidos) e que podem ser realizados nas próprias clínicas e hospitais, e a técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR, *polymerase chain reaction*) que é realizada em laboratórios especializados (LUTZ et al., 2009; HOSIE et al., 2009; HARTMANN, HOFMANN-LEHMANN, 2020; LITTLE et al., 2020).

As infecções retrovirais felinas também apresentam grande complexidade nas manifestações clínicas e na evolução das doenças. As características próprias de cada infecção retroviral (FIV e FeLV) resultam na necessidade de uso de diferentes testes (imunológicos e moleculares) para determinação do estágio da doença. Estudos demonstram o uso conjunto dos diferentes métodos laboratoriais permitindo um melhor acompanhamento clínico dos animais infectados (HARTMANN, HOFMANN-LEHMANN, 2020). Especificamente a PCR é a técnica com maior acurácia, pois apresenta maior especificidade e sensibilidade na detecção e a possibilidade de quantificação da carga viral. Portanto tem sido utilizada como confirmação dos outros testes realizados. A detecção por meio de PCR também viabiliza os estudos para maior eficácia de vacinação, a análise de casos complexos e dessa forma melhor prognóstico e tratamento da infecção (TANDON et al., 2008; HARTMANN, HOFMANN-LEHMANN, 2020).

Em virtude disso, o presente estudo visou inicialmente analisar a diversidade genética de FIV e FeLV através de um estudo *in silico*. Essa avaliação permitiu determinar as linhagens de FIV e FeLV atualmente disseminadas em gatos domésticos. O estudo das linhagens possibilitou também desenvolver e padronizar métodos de PCR precisos e eficientes para a detecção e quantificação das retrovírus estudadas. A determinação da performance analítica e diagnóstica dos métodos de PCR é fundamental para que os clínicos veterinários saibam como utilizar essa metodologia diagnóstica. Adicionalmente, também foi possível obter dados preliminares de prevalência desses retrovírus na cidade de Caxias do Sul, possibilitando a definição de ações para o controle dessas infecções na região.

2. Revisão de literatura

2.1. Vírus da imunodeficiência felina (FIV)

O FIV (*Feline immunodeficiency virus*) apresenta uma partícula cuneiforme e envelopada, com duas moléculas lineares de RNA de fita simples de polaridade positiva, não complementares, que unidas formam um dímero por pontes de hidrogênio (PEDERSEN et al., 1987; KENYON, LEVER, 2011; SYKES, HARTMANN, 2014). O ciclo biológico se inicia com a entrada do vírus na célula hospedeira. Ocorre em seguida, a transcrição do RNA viral em DNA viral, que se integra ao genoma da célula infectada, devido à ação da enzima integrase dando origem ao provírus, que é o genoma viral integrado no genoma das células infectadas. Posteriormente, a informação é traduzida e transcrita, resultando em mRNAs que farão a síntese de proteínas estruturais e das enzimas virais, e em cópias do RNA genômico necessárias nas novas partículas virais (DUNHAM, GRAHAM, 2008; KENYON, LEVER, 2011; O'KEEFE, 2013; SYKES, HARTMANN, 2014). A Figura 1 apresenta um esquema do ciclo biológico do FIV.

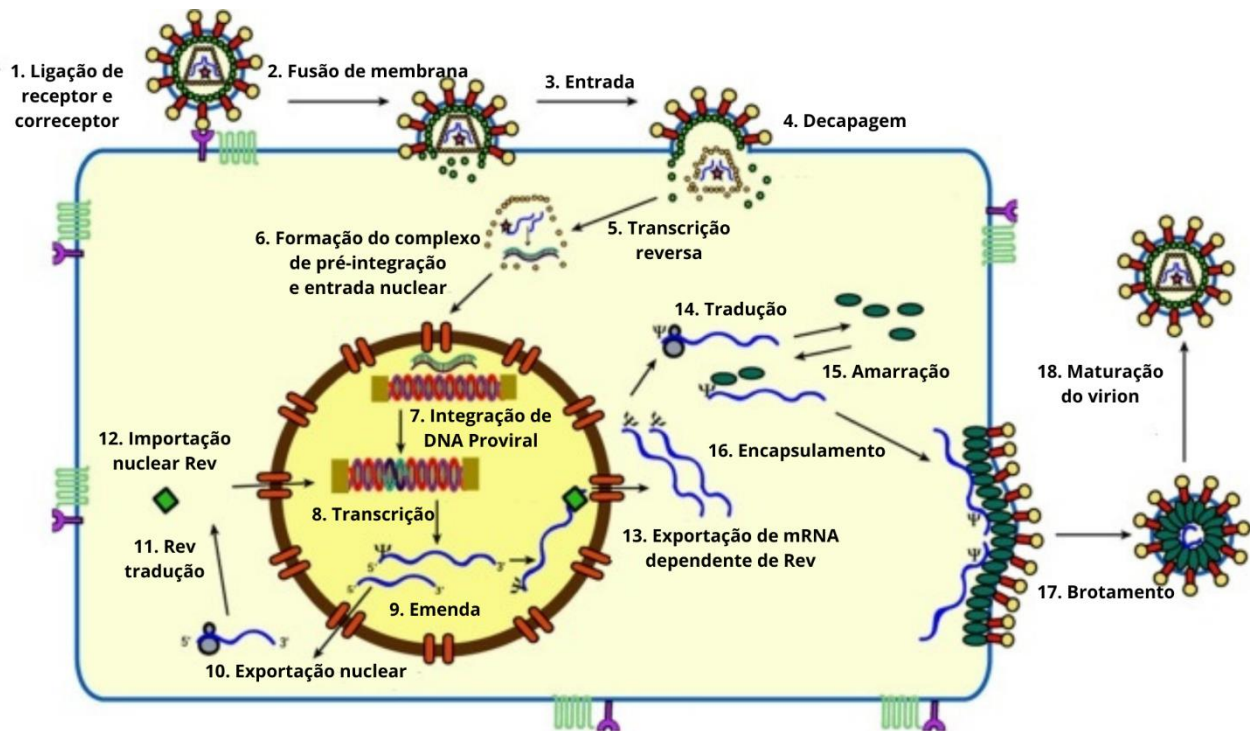


Figura 1 – Esquema do ciclo de replicação do vírus da imunodeficiência felina (FIV). Fonte: Adaptado de KENYON, LEVER, (2011).

O genoma do FIV consiste em três grandes regiões, como em todos os retrovírus, denominadas de *gag*, *pol* e *env*. O gene *gag* codifica as proteínas estruturais internas (p15, p24, p10). O gene *pol*, gene associado a polimerase, é responsável pela síntese das enzimas transcriptase reversa, integrase e protease e a dUTPase. E o gene *env*, associado ao envelope, codifica as proteínas do envelope viral, sendo elas as glicoproteínas de superfície (gp95) e (gp120), a glicoproteína de

transmembrana (gp41). O FIV apresenta ainda, além das três regiões genômicas principais, os genes acessórios *vif*, *ORF-A* e *rev*, responsáveis pela neutralização de citocinas da célula hospedeira, ativação da transcrição e exportação do núcleo viral durante a replicação (RAVAZZOLO, COSTA, 2007; KENYON, LEVER, 2011).

Os genes acessórios possibilitam a regulação temporal do padrão transcricional do vírus. O gene *vif* é essencial para a replicação viral nas fases iniciais após infecção. O gene *ORF-A* auxilia tanto na geração de novos vírus como no seu processo infeccioso. O gene *rev* articula o início da transcrição do RNA viral que codifica as proteínas estruturais do vírus, bem como do RNA viral genômico. A concentração citoplasmática de RNA mensageiro (mRNA) do gene *rev* estimula a passagem para a fase produtiva do ciclo replicativo (DUARTE et al., 2012). A Figura 2 exibe a estrutura genômica do FIV.

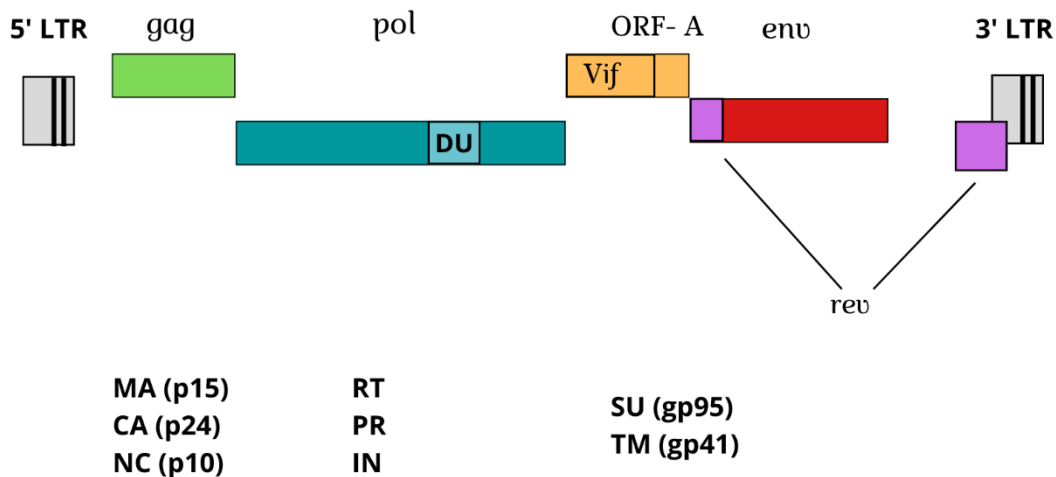


Figura 2 – Estrutura genômica do FIV. Os principais genes são *gag* (antígeno específico de grupo), *pol* (polimerase) e *env* (envelope). As principais proteínas virais apresentadas são: MA, matriz; CA, capsídeo; NC, nucleocapsídeo; RT, transcriptase reversa; PR, protease; IN, integrase; SU, proteína de superfície; e TM, proteína transmembrana. Possui ainda vários genes acessórios, incluindo *rev*, *vif*, DU (dUTPase) e ORF-A (quadro de leitura aberto A). LTR, regiões de repetição terminal longa que flanqueiam o provírus integrado e regulam a expressão do gene. Fonte: Adaptado de DURHAM, GRAHAM, (2008).

Os genes *gag* e *pol*, são relativamente conservados. O gene *env*, codificante das glicoproteínas do envelope, são mais variáveis e constituem os principais determinantes da diversidade de FIV (OLMSTED et al., 1989; HOSIE et al., 2009). As diferentes espécies de felinos parecem ser infectadas por subtipos específicos de FIV (BROWN et al., 1994; CARPENTER et al., 1996; CARPENTER et al., 1998; TROYER et al., 2005; FRANKLIN et al., 2007; PECON-SLATTERY et al., 2008; HAYWARD, RODRIGO, 2010). Os principais FIVs circulantes nos gatos domésticos (*Felis catus*) têm sido denominados *Fca* e sete subtipos ou clados geneticamente distintos (A, B, C, D, E, F e U-Zen) foram relatados na literatura até o momento, com vários graus de virulência e distribuição geográfica variável. Originalmente, a classificação foi baseada na variabilidade do gene

env (região V3-V5) que engloba grande variabilidade genética da gpSU (HAYWARD, RODRIGO, 2010; GRACE, 2011; SELTON, HARTMANN, 2012), com diversidade podendo atingir até 26% (SODORA et al., 1994; KANN et al., 2006). Estudos posteriores apontaram que o gene *gag* também pode ser usado para esta classificação (HOHDATSU et al., 1998; STEINRIGL, KLEIN, 2003). Ademais, Hayward e Rodrigo (2010), denotam que sequências de subtipo desconhecido foram relatadas. As sequências descritas em Portugal foram designadas subtipo F (DUARTE, TAVARES, 2006). E ainda, sequências *env* de felinos relatadas na Nova Zelândia foram apontadas como dissemelhantes de qualquer subtipo caracterizado antes, e foram denominados U-NZenv (HAYWARD et al., 2007; HAYWARD, RODRIGO, 2008; HAYWARD, RODRIGO, 2010).

2.1.1. Transmissão e manifestações clínicas

Após a infecção inicial, o FIV está presente no sangue, soro, plasma, líquido cefalorraquidiano (NORRIS et al., 2007). Os animais infectados apresentam altas concentrações de carga viral na saliva, que também contém leucócitos infectados, sendo dessa forma, o modo mais eficiente de transmissão é horizontal, por mordeduras (ARJONA et al., 2000; ALLISON, HOOVER, 2003). Felinos machos em idade adulta com acesso à rua possuem maior risco de infecção (LEVY et al., 2006), justamente pelo típico comportamento de brigas por demarcação de território, disputa de alimentos e reprodução (SOBRINHO et al., 2011; CHANG FUNG MARTEL et al., 2013). Além disso, a transmissão pode ocorrer por via iatrogênica por transfusão de sangue (LEITE et al., 2013; ALVES et al., 2015) ou uso de agulhas e outros instrumentos contaminados (HARTMANN, 2004). A transmissão por via sexual aparenta ser incomum no FIV, apesar do sêmen de gatos infectados apresentar o vírus infeccioso (JORDAN et al., 1998; LEVY et al., 2008).

A transmissão pode ocorrer também verticalmente, por via transplacentária (infecção intrauterina), e colostro ou leite quando as fêmeas gestantes forem portadoras do vírus (ARJONA et al., 2000; GRACE, 2004). A transmissão transplacentária já foi demonstrada em indivíduos gestantes na fase aguda da infecção (NORSWORTHY et al., 2004). Pode ocorrer ainda, o nascimento de animais infectados e sadios na mesma ninhada (GREENE, 2005), e mesmo indivíduos sadios podem se infectar pela saliva nos cuidados maternos (NORSWORTHY et al., 2004).

A maior parte das manifestações clínicas apresentadas pelos felinos não é causada diretamente pelo vírus, e sim devido à imunossupressão que ocorre na infecção pelo FIV (BANDECCHI et al., 1992; HOSIE et al., 2009; SCHERK et al., 2013). O FIV leva a uma infecção semelhante ao do vírus da imunodeficiência humana (HIV), com sinais clínicos em decorrência de uma infecção secundária (HOSIE et al., 2009; HARTMANN, 2011; HARTMANN, 2012; GIL, LEAL, 2012; SCHERK et al., 2013). Desse modo, a infecção pelo FIV aumenta o risco de doenças oportunistas gerais por diferentes microrganismos (*Cryptococcus*, micobactérias, *Demodex*, etc.) em diferentes tecidos animais, como

o trato respiratório superior, as cavidades oral e conjuntival, o intestino, a pele, o sistema nervoso central, entre outros (YAMAMOTO et al., 1989; DUNHAM, GRAHAM, 2008; HARTMANN, 2011; LITTLE et al., 2011; DUARTE et al., 2012; SELTON, HARTMANN, 2012).

O subtipo de FIV parece estar associado com a gravidade das doenças, uma vez que infecções por diferentes vírus parecem ter desfechos clínicos diferentes. A infecção pelo FIV A está relacionada com a evolução de doença neurológica, enquanto FIV B está associado a ocorrência de quadro de baixa morbidade e FIV C pode causar enfermidade aguda, promovendo severa imunodeficiência com 60% de mortalidade 18 semanas pós infecção (ROZIERES et al., 2008; HAYWARD, RODRIGO, 2010).

A infecção pelo FIV ocorre em três estágios / fases: aguda, clinicamente assintomática e terminal, por vezes denominada de "síndrome da imunodeficiência adquirida felina" ("FAIDS") (ENGLISH, 1995; GOTO et al., 2000; WESTMAN, MALIK, NORRIS, 2019). Na fase aguda da infecção, que pode durar dias a semanas, o animal fica virêmico e normalmente acontece a progressão de sinal clínico fugaz e transitório, associado à replicação viral, em que o animal pode manifestar anorexia, febre, letargia, sinais de enterite e/ou aumento generalizado dos linfonodos (DUNHAM, GRAHAM, 2008; GRACE, 2011; HARTMANN, 2011; DUARTE et al., 2012; SELTON, HARTMANN, 2012; SYKES, HARTMANN, 2014; WESTMAN, MALIK, NORRIS, 2019). A maioria dos sinais normalmente desaparece rapidamente, mas o aumento dos linfonodos pode perdurar durante semanas ou meses (DUNHAM, GRAHAM, 2008; HOSIE et al., 2009; DUARTE et al., 2012; SYKES, HARTMANN, 2014). Na maioria dos gatos a fase aguda pode passar sem que seja notada (GRACE, 2011). Ao longo da fase assintomática, a replicação viral é limitada e o indivíduo não exhibe sinais clinicamente detectáveis, podendo ser sadio (DUNHAM, GRAHAM, 2008; GRACE, 2011; DUARTE et al., 2012; GIL, LEAL, 2012; WESTMAN et al., 2019). A durabilidade desse período é variável, pode durar meses a anos e os gatos não manifestam sinais clínicos evidentes (HOSIE et al., 2009; GRACE, 2011; HARTMANN, 2011; GIL, LEAL, 2012). A duração desse estágio é diferente para cada indivíduo e depende de fatores como idade, estado de saúde do animal no período da infecção, dose e via de inoculação do vírus, competência imunológica, patogenicidade do subtipo viral, e exposição a agentes patógenos secundários (PEDERSEN et al., 2001; GLEICH, KRIEGER, HARTMANN, 2009; HARTMANN, 2011; SELTON, HARTMANN, 2012). A fase terminal da infecção é caracterizada pelo aumento da replicação viral e ocorrência de doença clínica, principalmente devido a uma linfocitopenia das células T CD4⁺ (WESTMAN, MALIK, NORRIS, 2019). Geralmente, se expressa dos 4 aos 6 anos de vida (HOSIE et al., 2009). Na fase terminal (FAIDS), a maioria das manifestações clínicas são devido a infecções concomitantes e oportunistas, além de neoplasia, mielossupressão e alterações neurológicas (GRACE, 2011; HARTMANN, 2011; DUARTE et al., 2012; SELTON, HARTMANN, 2012; SYKES, HARTMANN, 2014). Podem

ocorrer perda de peso, diarreia persistente, gengivoestomatite, infecção do trato respiratório superior crônico/persistente, linfadenopatia (HOSIE et al., 2009; GRACE, 2011) e doença dermatológica crônica (GRACE, 2011).

2.1.2. Epidemiologia

Esse retrovírus é distribuído mundialmente, principalmente em gatos domésticos (HOSIE et al., 2009). A ocorrência nos felinos silvestres também tem sido relatada em diversos locais do mundo. O FIV já foi detectado em leões (*Panthera leo*), leopardos (*Panthera pardus*), tigres (*Panthera tigris*), pumas (*Puma concolor*), leopardos da neve (*Panthera uncia*), onças (*Panthera onca*), guepardos (*Acinonyx jubatus*) e lincês (*Lynx rufus*). Apesar de estudos demonstrarem menor patogenicidade com poucas alterações imunológicas ou sinais clínicos serem observados, disfunção imunológica (com depleção de células T CD4⁺ e redução na proporção CD4/CD8) já foi relatada em felinos não domésticos (BARR et al., 1989; COURCHAMP, PONTIER, 1994; HARTMANN, 2004; FILONI et al., 2008; HAYWARD, RODRIGO, 2010).

A maioria dos FIVs identificados pertence aos subtipos A e B, com uma frequência menor dos demais (C, D, E, F e U). Também tem sido observada uma predominância de subtipos específicos em determinadas regiões geográficas. No Reino Unido, apenas os vírus do subtipo A são encontrados (HOSIE et al., 2009). Os FIVs do subtipo B também são distribuídos em todo o mundo, sendo detectados principalmente no leste do Japão, Itália e leste dos Estados Unidos. O subtipo C já foi descrito no Canadá, Estados Unidos, Europa, Taiwan e Vietnã (SODORA et al., 1994; BACHMANN et al., 1997; ELDER et al., 2010; TEIXEIRA et al., 2011; HARTMANN, 2012). O subtipo D foi descrito no Japão e Vietnã (KAKINUMA et al., 1995; DUARTE, TAVARES, 2006). Na Argentina o subtipo E foi identificado (HOSIE et al., 2009). Em Portugal isolou-se os subtipos A, B e F (DUARTE et al., 2002; DUARTE, TAVARES, 2006; WEAVER, 2010). Os subtipos F e U, foram encontrados nos Estados Unidos e na Nova Zelândia, respectivamente, sendo, entretanto, raramente detectados (SODORA et al., 1994; HOSIE et al., 2009; WEAVER, 2010; GRACE, 2011). A Figura 3 apresenta a distribuição dos subtipos nos diferentes continentes.

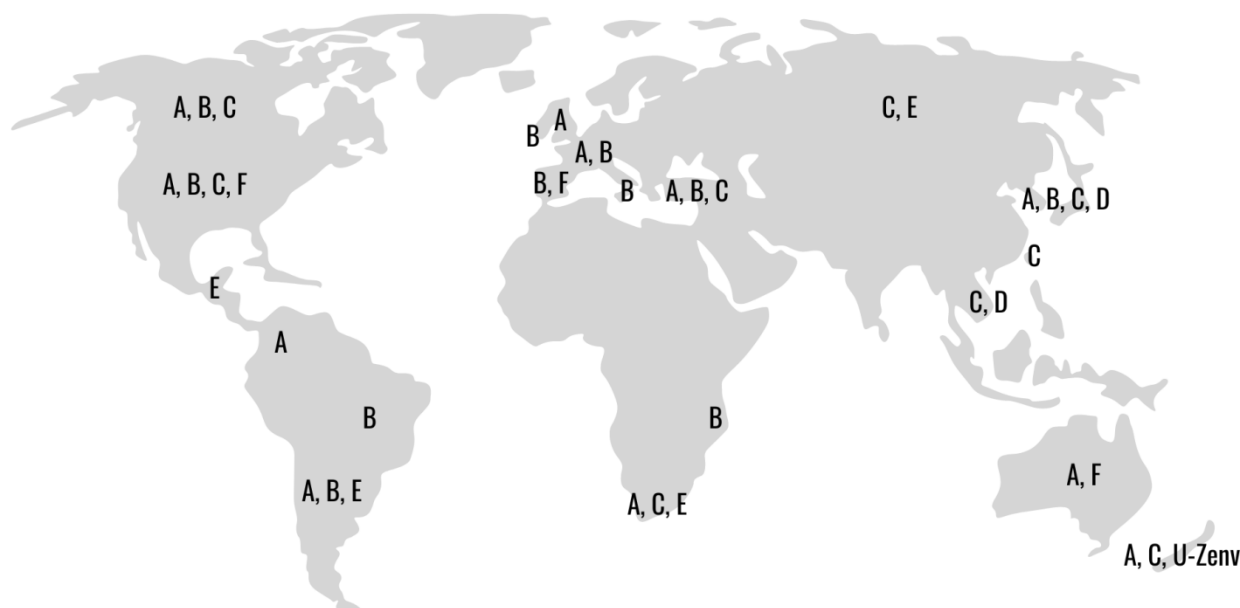


Figura 3 – Distribuição geográfica mundial dos subtipos A, B, C, D, E, F e U-Zenv de FIV. Fonte: Adaptado de HOSIE et al. (2009).

No Brasil, parece ocorrer a predominância de subtipo B, tendo sido identificado em estudos realizados nos estados de Minas Gerais, São Paulo, Rio Grande do Sul, Rio de Janeiro e Distrito Federal (CAXITO et al., 2006; LARA et al., 2007; MARTINS et al., 2008; TEIXEIRA et al., 2012; MARÇOLA et al., 2013; CANO-ORTIZ et al., 2017). Também existe um relato recente de circulação do subtipo A em felinos no Maranhão (MARTINS et al., 2018; TEIXEIRA et al., 2019).

2.1.3. Diagnóstico

A infecção pode ser identificada pela detecção do FIV no sangue total, plasma e soro dos animais infectados. Os gatos com FIV têm infecção persistente e possuem cargas virais não muito elevadas e intermitentes durante a maior parte das suas vidas, sendo assim, métodos que detectam anticorpos no sangue periférico dos animais são os mais apropriados para triagem de rotina caso o indivíduo não tenha sido previamente vacinado para o vírus (KOLENDA-ROBERTS et al., 2007; LEVY et al., 2008; SAND et al., 2009).

Os testes de triagem existentes possibilitam a identificação de anticorpos contra antígenos retrovirais, especialmente para o p24 (LEVY et al., 2008; HOSIE et al., 2009). Esses testes são baseados nas técnicas de imunocromatografia e ensaio imunoenzimático indireto (ELISA - *Enzyme-linked immunosorbent assay*) (CRAWFORD, LEVY, 2007; HOSIE et al., 2009; SELTON, HARTMANN, 2012; SYKES, HARTMANN, 2014; LITTLE et al., 2020). O ELISA é um método sorológico indireto que se fundamenta na detecção de anticorpos para as proteínas p15 (da matriz) e glicoproteína transmembranar gp41 em uma placa de micropoços (LITTLE et al., 2020). Embora

exista a eventualidade de falsos-positivos e falsos-negativos, essa técnica é bastante utilizada pois expressa uma sensibilidade de 98,3% e uma especificidade de 100% (COURCHAMP et al., 1998; LEVY et al., 2006; SELTON, HARTMANN, 2012; SYKES, HARTMANN, 2014). A imunocromatografia é o método de imunomigração rápida, também conhecido como teste rápido, que identifica anticorpos para a proteína p15 e/ou glicoproteína gp41 para FIV e o antígeno p27 para FeLV (REID et al., 1992; CRAWFORD, LEVY, 2007; HOSIE et al., 2009; AMMERSBACH, BIENZLE, 2013; WESTMAN et al., 2015; LITTLE et al., 2020). Geralmente, quando os testes para FIV positivam é indicado que se realize a confirmação desse diagnóstico por meio de outras técnicas. Isso ocorre dado que esses resultados possam ser menos exatos uma vez confrontados com os negativos e, principalmente, referindo-se a gatos com risco reduzido e clinicamente assintomáticos (HARTMANN et al., 2007; LEVY et al., 2008; HOSIE et al., 2009; LITTLE et al., 2020). Para realizar essa confirmação dos resultados, estão disponíveis testes de isolamento retroviral, ensaios de imunofluorescência por anticorpo indireta (IFA - *Immunofluorescent Antibody*), o Western Blot e a PCR (LEVY et al., 2017).

A IFA indireta identifica anticorpos contra uma diversidade de antígenos virais, apesar disso, possui sensibilidade e especificidade reduzida, comparada aos testes de triagem realizados na rotina clínica (ANDERSEN, TYRRELL, 2004; HARTMANN et al., 2007; LEVY et al., 2008).

A análise de Western blot detecta anticorpos específicos que reconhecem proteínas estruturais virais e é vista como o “padrão ouro” para o diagnóstico de FIV. É um teste muito utilizado na confirmação de resultados inconclusivos (JORDAN et al., 1996; HARTMANN et al., 2007; LEVY et al., 2008; HOSIE et al., 2009).

O isolamento do vírus do sangue periférico em cultura é um método considerado padrão no diagnóstico por ser confiável e conclusivo, porém é muito caro e impraticável para uso rotineiro (JORDAN et al., 1996; LEVY et al., 2008; HOSIE et al., 2009).

A PCR tem se tornado uma técnica fundamental na detecção direta do FIV. É uma técnica abrangente que possui diversas variações (WILLET, HOSIE, 2013). A PCR convencional identifica o DNA proviral duas semanas após o contato inicial com o vírus e tem sido proposto como método diagnóstico capaz de definir o real status da infecção no indivíduo (BIENZLE et al., 2004; CRAWFORD et al., 2005; LEVY et al., 2008). Deste modo, a PCR em tempo real pode ser aplicada para diferenciar de forma definitiva a infecção real pelo vírus ou um caso de presença de anticorpos vacinais (CRAWFORD et al., 2005; LEVY et al., 2008; WANG et al., 2010; AMMERSBACH, BIENZLE, 2013). Além disso, esses critérios podem ser meios pertinentes para que se conheça os mecanismos que levam à proteção após a vacinação (HOFMANN-LEHMANN et al., 2001; LITTLE et al., 2020). É de suma importância ressaltar ainda que isso não se aplica no nosso país, pois ainda não existem vacinas comerciais para FIV.

Métodos de PCR em tempo real também possibilitam a determinação da carga viral, (KLEIN, 2002). A possibilidade de detecção e quantificação molecular pode viabilizar critérios adicionais (marcadores) para caracterização mais precisa da patogênese de infecção dos retrovírus (HOFMANN-LEHMANN et al., 2001). Outra aplicação possível é determinar a carga viral nos tumores (STAEHELIN et al., 1976; NEEL et al., 1981; HAYWARD, NEEL, ASTRIN, 1981; VARMUS, 1984; KLEIN et al., 1999).

2.2. Vírus de leucemia felina (FeLV)

O FeLV (*Feline leukemia virus*) apresenta uma partícula envelopada com RNA fita simples como material genético (HARTMANN, 2006). O ciclo biológico inicia com a ligação à célula hospedeira. Ocorre em seguida a introdução do genoma viral na célula. O RNA é transcrito reversamente para DNA (provírus) pela RNA polimerase viral que tem atividade de transcrição reversa (RT, *transcriptase reversa*). O DNA proviral desloca-se para o núcleo durante a divisão celular onde se incorpora ao DNA cromossômico do hospedeiro com o auxílio da integrase viral, sendo transmitido às células-filhas junto ao genoma do animal. O provírus sintetiza o RNA - mensageiro, estabelecendo a produção de 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). A Figura 4 apresenta um esquema do ciclo de replicação de FeLV.

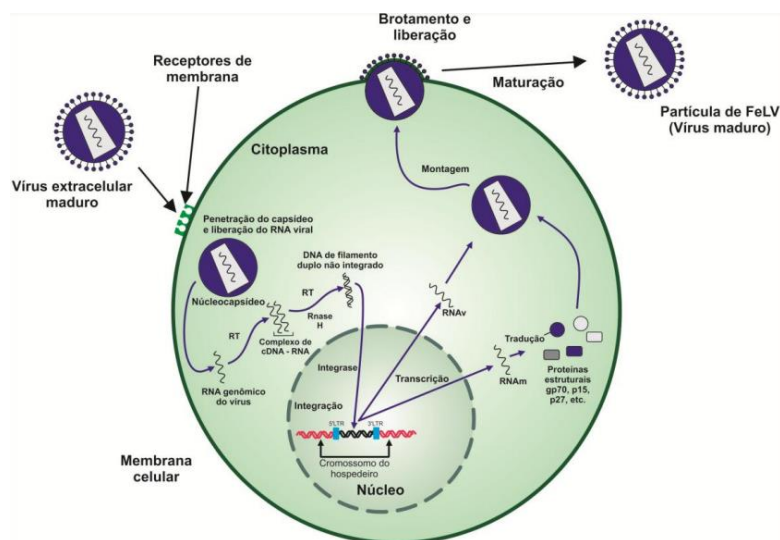


Figura 4 – Esquema do ciclo biológico do FeLV. Fonte: Adaptado de ORNELAS, (2012).

O provírus contém sequências repetidas (*Long Terminal Repeat* - LTR) nas suas extremidades, que possuem função de regular e controlar a expressão dos genes virais. Entre essas regiões, encontram-se os genes *gag* que codifica as proteínas estruturais internas (p15c, p12, p27 e

p10), *pol* que codifica as proteínas envolvidas na replicação viral (Integrase, RT) e *env* que codifica as proteínas do envelope viral gp70 e p15e (HARTMANN, 2006). Uma outra proteína (p12) pode ser também produzida (FREED, 2002; WANAGURU et al., 2018). A Figura 5 apresenta o esquema do genoma do FeLV.

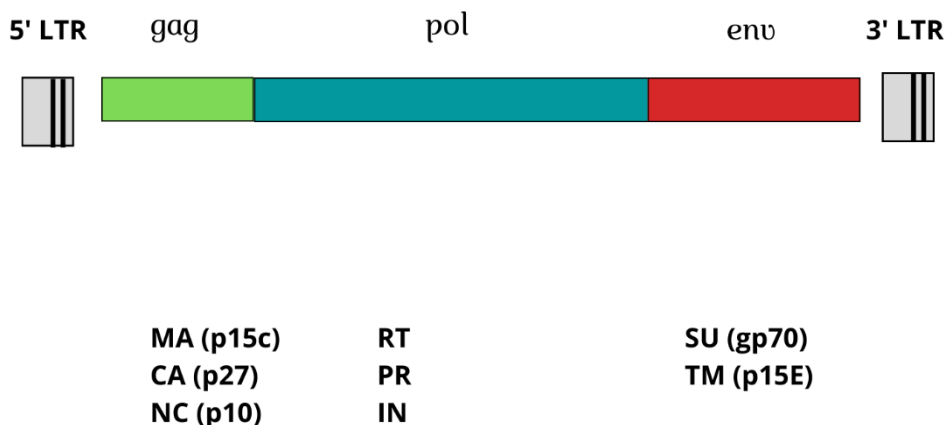


Figura 5 – Estrutura genômica do FeLV. Os genes principais são *gag* (grupo antígeno específico), *pol* (polimerase) e *env* (envelope). As principais proteínas/enzimas apresentadas são: MA: matriz; CA: capsídeo; NC: nucleocapsídeo; RT: transcriptase reversa; PR: protease; IN: integrase; SU: proteína de superfície; e TM: proteína transmembranar. As regiões não codificantes LTRs (regiões de repetição terminais longas) flanqueiam o provírus integrado. Fonte: Adaptado de DURHAM, GRAHAM, (2008).

Em felinos, constata-se a ocorrência de retrovírus exógenos (“patogênicos”) e endógenos (“não patogênicos”). Os retrovírus endógenos (ERVs) são elementos genômicos que estão presentes em diversos animais (GARCIA-ETXEBARRIA, SISTIAGA-POVEDA, JUGO, 2014). No caso de FeLV esses elementos são denominados enFeLVs e estão integrados ao genoma de indivíduos do gênero *Felis*. Estudo no genoma de *Felis catus* identificou 219 elementos endógenos (SONG et al., 2013). Eles podem elevar a patogenicidade do FeLV exógeno (exFeLV), recombinando-o com o FeLV exógeno (FeLV A) e resultando no desenvolvimento de outros subtipos de FeLV mais patogênicos (POLANI et al., 2010; HARTMANN, HOFMANN-LEHMANN, 2020). Assim, o FeLV endógeno é um precursor de subtipos recombinantes, como por exemplo FeLV-B (PANDEY et al., 1991; ARJONA et al., 2007; POWERS et al., 2018). Eventos de recombinação entre FeLV exógeno e endógeno são agentes na formação de diversos novos subtipos de FeLV (ELDER, MULLINS, 1983; MIYAZAWA, 2002; LEVY, 2008; ANAI et al., 2012; KAWASAKI, NISHIGAKI, 2018; ERBECK et al., 2021).

O FeLV apresenta uma população de tipos virais geneticamente ampla, sendo continuamente adaptada por pressões seletivas *in vivo* e da qual surgem variantes como espécies predominantes (HOOVER, MULLINS, 1991; OVERBAUGH, BANGHAM, 2001). A essência dessas variantes, sua

relação com as doenças, em especial as malignas, e os mecanismos seletivos que levam à sua predominância têm sido foco de pesquisa por muitos anos (BOLIN, LEVY, 2011).

Os FeLVs exógenos, que são os principais tipos virais com via horizontal de infecção, foram caracterizados em quatro subtipos geneticamente e funcionalmente distintos: A, B, C e T (ORTEGA et al., 2020). Todos decorrem de uma contaminação anterior do indivíduo pelo subtipo A, sofrendo mutação, inserção e recombinação com sequências retrovirais celulares ou endógenas do DNA (BENVENISTE et al., 1975; STEWART, 1986; SYKES, HARTMANN, 2014; MIYAKE et al., 2019). Esses subtipos apresentam tropismos modificados devido ao uso diferencial do receptor de entrada na célula hospedeira (MIYAKE et al., 2019). O FeLV B está relacionado ao surgimento de tumores (JARRETT, RUSSELL, 1978; HARTMANN, 2012a). O FeLV-C é formado a partir de mutações no gene *env*, na sequência do SU e está associado à anemia aplásica (MACKEY et al., 1975; HARDY JUNIOR et al., 1976). O FeLV-T possui tropismo por linfócitos T e é formado a partir de uma mutação no gene *env* da FeLV A e está relacionado à imunossupressão (LUTZ et al., 2009; HARTMANN, 2012a). Há pouco tempo, outros subtipos foram descritos na literatura, como FeLV D (ANAI et al., 2012) e o FeLV E (MIYAKE et al., 2016).

As variações nos genomas caracterizam os diferentes subtipos. O enFeLV é geneticamente distinto do FeLV A, com diferenças de nucleotídeos observadas em repetições terminais longas (LTR), *gag* e *env*. FeLV B é formado pela recombinação do enFeLV *env*-LTR com FeLV A. O local de recombinação 5' é mais conservado do que o local 3'. FeLV C e T têm inserções focais, substituições e deleções dentro do vírus FeLV A parental em diferentes regiões. FeLV D exibe um evento de recombinação com outro vírus endógeno de gato doméstico (CHIU et al., 2018). A Figura 6 demonstra as diferenças nos genomas dos diferentes subtipos de FeLVs.

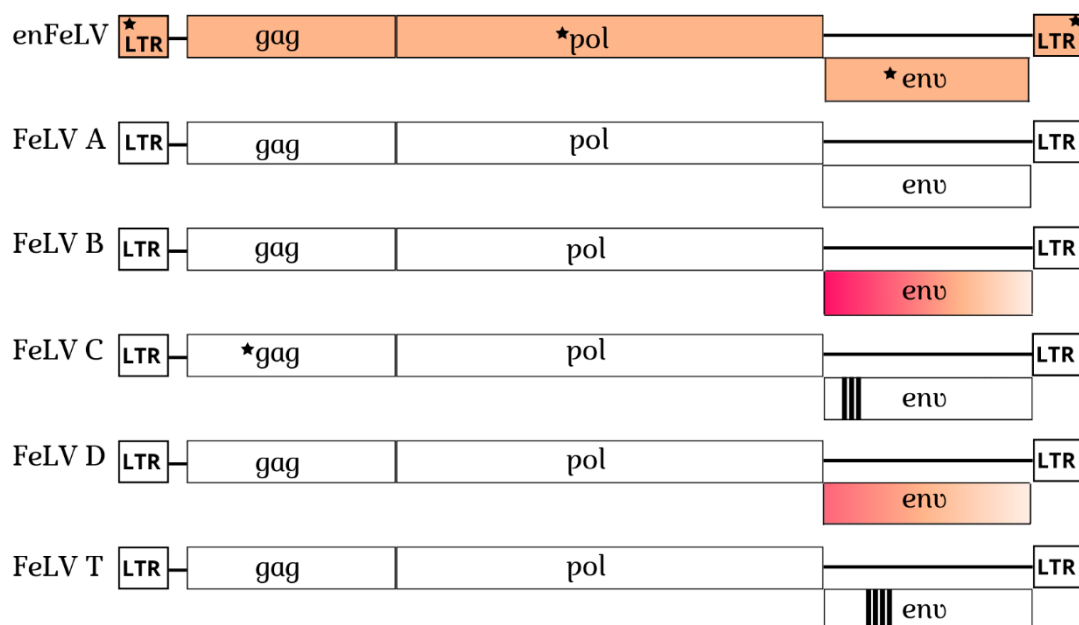


Figura 6 – Estruturas genômicas dos subtipos de FeLV descritas até o momento. As inserções são mais frequentemente localizadas no *env* 5' e são demarcados aqui por barras verticais em negrito, com cada linha denotando um mínimo de uma inserção de aminoácido. Estrelas denotam a presença de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) que estão altamente concentrados nos respectivos genes entre FeLV A e outros subtipos. Fonte: Adaptado de CHIU et al., (2018).

2.2.1. Transmissão e manifestações clínicas

A transmissão do FeLV pode ser horizontal ou vertical. A forma horizontal é mais frequente e ocorre pelo contato amigável ou agressivo entre os animais (HARTMANN, HOFMANN-LEHMANN, 2020). A transmissão do vírus ocorre principalmente pela via oronasal, por contato com secreções, contaminados através de lambedura, brigas e uso de utensílios infectados. A saliva é o principal meio de eliminação do vírus devido à alta concentração viral (SOUZA, TEIXEIRA, 2003; GREENE, 2005). Mas pode ocorrer também pelo contato com secreções corporais, como urina e fezes. Outras formas de transmissão (iatrogênica e pulgas) também devem ser consideradas (VOBIS et al., 2003; GREENE, 2005; GOMES-KELLER et al., 2006; LUTZ et al., 2009; HARTMANN, 2012a; ALVES et al., 2015). Já a forma vertical pode ocorrer via transplacentária, pelo leite, ou durante os cuidados de limpeza e higiene dos filhotes (NORSWORTHY et al., 2004). A infecção ocorre independente de sexo ou raça dos indivíduos, mas a suscetibilidade é maior em filhotes e reduz gradativamente com o aumento da idade. Os machos que possuem mais acesso a rua também têm maior predisposição à contaminação com FIV (GREENE, 2005; LUTZ et al., 2009).

O resultado da infecção é diferente em cada indivíduo, dependendo também da patogenicidade da cepa e da carga viral (GREENE, 2005; ORTEGA et al., 2020). O sistema imunológico do felino estabelece um combate contra o vírus, principalmente na fase inicial da infecção (geralmente nas suas primeiras doze semanas) onde será definido o rumo da infecção na maioria dos indivíduos. Logo, a

infecção pode se desenvolver em diferentes estágios da doença (HOFMANN-LEHMANN, HARTMANN, 2020). Em geral, os processos infecciosos são classificados em abortivos, regressivos, progressivos e focais ou atípicos (TORRES et al., 2005; HOFMANN-LEHMANN et al., 2008; LITTLE et al., 2020).

A infecção abortiva, na qual o gato é exposto, provavelmente, a uma pequena carga viral e este é imunocompetente, está restrita ao processo de replicação viral inicial, sem manutenção da viremia. Nesse caso, a única indicação de infecção por FeLV é a detecção de altos níveis de anticorpos anti-FeLV (HARTMANN, 2012; ENGLERT et al., 2012; BOENZLI et al., 2014; WESTMAN et al., 2019).

A infecção regressiva, na qual o gato apresenta uma resposta imune que contém a replicação e expressão do vírus, mas não sem eliminá-lo totalmente. O animal apresenta ausência de antígenos de FeLV (p27) em testes sorológicos, mas cargas provirais (em geral baixas). Gatos com essa forma de infecção não são capazes de liberar vírus infeccioso, mas existem relatos de que o DNA proviral é infeccioso via transfusão sanguínea e pode promover viremia e doença relacionada ao FeLV em indivíduos vulneráveis (NESINA et al., 2015). Esses animais apresentam títulos constantemente altos de anticorpos neutralizantes de vírus e manifestam baixo risco de evolução para doenças relacionadas (HOFMANN-LEHMANN et al., 2001). Ainda que não haja eliminação do vírus, a informação para a produção de partículas virais está presente no genoma celular do gato que, ao sofrer imunossupressão, resulta na reativação da infecção latente. Dessa forma, se tornam virêmicos e desenvolvem doenças associadas ao FeLV (HARTMANN, 2012a). A possibilidade de reativação da viremia reduz com o decorrer do tempo, contudo foi constatada a capacidade de reter a replicação viral devido ao provírus integrado na célula hospedeira (HELFER-HUNGERBUEHLER et al., 2010). Em alguns gatos a infecção regressiva pode estar relacionada a doenças como linfomas (STUTZER et al., 2011; MCLUCKIE et al., 2018) e supressão da medula óssea (STUTZER et al., 2010).

A infecção progressiva não é reprimida pelos anticorpos do hospedeiro e FeLV continua a se replicar amplamente, primeiramente nos tecidos linfóides locais, seguido da medula óssea e, posteriormente, nos tecidos epiteliais da mucosa e glandular (ROJKO et al., 1979; LITTLE et al., 2020). Os felinos são permanentemente virêmicos. Constata-se alta carga viral, promovendo a disseminação do vírus para o resto da vida, além de desenvolver doenças que podem levar o indivíduo a óbito em um curto período de tempo (HARTMANN, 2012a; WILLET, HOSIE, 2013; LITTLE et al., 2020). Nesses casos, tanto os testes sorológicos e de detecção de antígeno, quanto os testes mais específicos como a PCR podem detectar o FeLV (HOFMANN-LEHMANN et al., 2007; LITTLE et al., 2020).

Infecção focal ou atípica, se caracteriza por uma replicação viral persistente restrita em alguns órgãos, ou tecidos, sem o acometimento sistêmico do indivíduo (por exemplo, nas glândulas

mamárias, bexiga, olhos). Essa infecção é apontada como rara de acontecer naturalmente, sendo observada principalmente em infecções experimentais. O diagnóstico desse padrão de infecção é desafiador pois a produção de p27 é intermitente ou muito baixa, portanto, esses animais podem ter resultados fracamente positivos ou discordantes (ora negativo, ora positivo) nos testes de antígeno (GOMES-KELLER et al., 2009; HARTMANN, 2012b).

2.2.2. Epidemiologia

O FeLV encontra-se amplamente distribuído e acomete principalmente gatos domésticos em todo o mundo. Casos de infecção por FeLV em outros felídeos também têm sido reportados, como por exemplo em lincos europeus e ibéricos (*Lynx lynx* e *Lynx pardinus*), gato selvagem (*Felis silvestres*) e pumas da Flórida (*Puma concolor coryi*) (OSTROWSKI et al., 2003; LUACES et al., 2008; MELI et al., 2009; CUNNINGHAM et al., 2008).

A soroprevalência de FeLV tem sido estudada no mundo ao longo dos anos, caracterizando a disseminação mundial do vírus com dados de frequência de diferentes locais. As prevalências relatadas em estudos anteriores variam de 2,9% a 59,4% dependendo do local, população (sadios x doentes) e procedência (rua, abrigo ou domiciliado) em que o estudo foi realizado. Estudos feitos no Japão com animais sadios constataram uma prevalência de 2,9% de FeLV (MARUYAMA et al., 2003), estudos de Arjona et al. (2007) na Espanha evidenciaram uma prevalência de 37,5%, na Alemanha a taxa de prevalência obtida foi de 3,6% (GLEICH, KRIEGER, HARTMANN, 2009), na Malásia Bande et al. (2012) relatou uma prevalência de 12,2% e num estudo recente de Sivagurunathan, Atwa e Lobetti (2018) obteve-se uma taxa de 1,2%. Um estudo realizado entre Estados Unidos e Canadá constatou uma prevalência de 3,1% (BURLING et al., 2017), na Nova Zelândia a taxa do vírus foi de 1,0% (GATES, VIGEANT, DALE, 2017), e estudos recentes no Vale do Aburrá na Colômbia evidenciaram uma prevalência de 59,4% (ORTEGA et al., 2020).

No Brasil, os estudos realizados detectaram uma grande diversidade de casos positivos, de acordo com a região avaliada e metodologia diagnóstica usada (ORTEGA et al., 2020). Almeida et al. (2012) constataram uma incidência de 11,5% no Rio de Janeiro. Já em Minas Gerais, um estudo revelou uma taxa de infecção de 47% (COELHO et al., 2008). E no nordeste do país foi demonstrada uma prevalência de 3% de infecção pelo FeLV (LACERDA et al., 2017). Esses estudos são preliminares, e não foram desenhados com a finalidade de obter dados epidemiológicos mais consistentes.

A incidência da infecção é maior em filhotes do que gatos adultos ou idosos. Isso ocorre em virtude do número de receptores celulares fundamentais para o FeLV invadir as células e iniciar a replicação (ALVES et al., 2015). Estudo relatou um risco 22,9 vezes maior de soropositividade em gatos machos de até três anos de idade (FERNANDES, 2015). Outro estudo de 2017 destacou que

gatos positivos para o FeLV possuem maior probabilidade de manifestar anemia e leucopenia (COSTA et al., 2017). Além disso, felinos machos que apresentaram comportamento agressivo apresentaram maior chance de infecção pelo FeLV (BIEZUS et al., 2017).

Com relação aos subtipos, estudos epidemiológicos anteriores relatam que os animais que são positivos para FeLV B podem ser isolados em 30 a 60% dos gatos infectados, mas apenas em conjunto com FeLV A (NEIL et al., 1991; PHIPPS et al., 2000; COELHO et al., 2008; ORTEGA et al., 2020). Um surto de FeLV relatado em populações de lincos ibéricos (*Lynx pardinus*) no sul da Espanha evidenciou que o FeLV encontrado nos indivíduos estava intimamente relacionado ao subtipo A (MELI et al., 2010; GERET et al., 2011). Powers et al. (2018) analisaram uma colônia de reprodução privada composta por híbridos de leopardo e gato doméstico e detectaram co-infecção por FeLV B em 68% dos gatos infectados por FeLV A. Correlacionaram também a presença de FeLV B com cargas provirais e viremias mais altas. Em 2019, Chiu et al. (2019) apresentaram um caso de FeLV B em panteras da Flórida (*Puma concolor coryi*). Nos estudos de prevalência e diversidade genômica do FeLV na Colômbia, foi revelada a prevalência do subtipo A em todas as amostras positivas, sendo que duas amostras apresentavam co-infecção com o subtipo B (ORTEGA et al., 2020).

No Brasil, estudo filogenético realizado com gatos domésticos relatou a ampla circulação do FeLV B (COELHO et al., 2018). As amostras desse subtipo foram mais semelhantes às sequências endógenas e aos isolados naturais de FeLV B. Estudo realizado por Filoni et al. (2017), relatou a prevalência do subtipo FeLV A em um grupo de *Puma yagouaroundi* mantido em cativeiro na Fundação Parque Zoológico de São Paulo. Silva et al. (2016) descreveram a ocorrência de FeLV B em onças-pintadas de vida livre (*Panthera onca*) na Estação Ecológica Taiamã, no Pantanal, Mato Grosso.

2.2.3. Diagnóstico

A infecção por FeLV pode ser identificada pela detecção do vírus no sangue total, plasma, soro, secreção conjuntival ou oral dos animais infectados (VICTOR et al., 2020). Os métodos rápidos imunocromatográficos e o PCR têm sido crescentemente usados nos últimos anos.

A triagem diagnóstica de rotina clínica mais utilizada são os testes que se baseiam na imunomigração rápida (imunocromatografia ou fluxo lateral). A imunocromatografia é um diagnóstico de sensibilidade e especificidade (HOSIE et al., 2009; HARTMANN, 2012b). O teste imunocromatográfico é rápido, pois permite a obtenção de resultado em cerca de 10 minutos pela detecção do antígeno viral central p27, que é produzido abundantemente na maioria dos gatos infectados (HARTMANN, 2012b).

Também existem os testes de detecção de anticorpos anti-FeLV. Os primeiros que foram desenvolvidos não possibilitavam a distinção dos anticorpos vacinais e maternos (FLYNN et al.,

2002). A quantidade de anticorpos específicos contra FeLV é pequena em gatos com infecção regressiva, mas elevada em animais virêmicos com infecção progressiva. É possível que os indivíduos desenvolvam anticorpos contra o enFeLV, o que não indica a infecção com o vírus, ocasionando resultados falso-positivos (FROMONT, PONTIER, LANGLAIS, 2003; BISOL, 2016). Em vista disso, testes para detecção de anticorpos de FeLV não são usados rotineiramente. Contudo, Boenzli et al. (2014) apresentou em seu estudo um teste POC (*point-of-care*) que foi introduzido recentemente no mercado europeu, com uma sensibilidade no valor mínimo de 77% e especificidade de 85,6% para a detecção de anticorpos específicos para a proteína p15E, e ainda possibilitou a distinção de animais naturalmente infectados de animais vacinados, devido aos indivíduos vacinados apresentarem níveis mínimos destes anticorpos. Ainda assim, anticorpos são dificilmente detectados em infecções persistentes (HARTMANN, 2012b; HARTMANN, HOFMANN-LEHMANN, 2020). Mais estudos controlados são necessários para definir se este teste pode presumir com garantia a infecção por FeLV ou imunidade contra o FeLV, e se poderá ser realizado, por exemplo, como um teste de pré-vacinação (HARTMANN, HOFMANN-LEHMANN, 2020). Alguns estudos relatam ainda a detecção de anticorpos p45 (a forma não glicosilada da unidade de superfície gp70 da glicoproteína do envelope) de FeLV em amostras de plasma (MAJOR et al., 2010; ENGLERT et al., 2012).

Entre os testes comerciais, o teste combo FeLV/FIV (SNAP) de imunocromatografia de fluxo bidirecional que é capaz de detectar o antígeno p27 do FeLV e os anticorpos da classe IgG anti-FIV (anticorpos direcionados para os antígenos p15, p24 e gp40) no mercado brasileiro. A sensibilidade e a especificidade do teste para o FeLV são de 98,6% e 93,5%, respectivamente; para o FIV, a sensibilidade é de 93,5% e a especificidade é de 100% (MEDEIROS et al., 2019).

A PCR em tempo real (qPCR), possibilita a identificação de felinos com a presença de DNA proviral e de RNA viral do FeLV (CATTORI et al., 2006; TANDON et al., 2008; FIGUEIREDO, ARAÚJO JÚNIOR, 2011; WILLET, HOSIE, 2013). Estudo propõe o uso desse método para classificar as infecções em abortivas, regressivas e progressivas, contribuindo na determinação do prognóstico e estabelecimento do manejo clínico adequado (FIGUEIREDO, ARAÚJO JÚNIOR, 2011). O teste possibilita a análise de FeLV em culturas, sangue e tecidos, tanto fresco ou fixado, no decorrer de uma semana após à contaminação (LEVY et al., 2008; HARTMANN, 2006).

Desse modo, a PCR é um exame capaz de confirmar animais positivos para FeLV. Além disso, é bastante utilizada nas situações em que os resultados se mostram discordantes e se mantém por vários meses com ELISA positivo e IFA negativo ou quando o animal manifesta sintomas suspeitos de FeLV. Estudos atestam que entre 5 a 10% dos indivíduos testaram positivo para a técnica de PCR, porém apresentaram resultados negativos nos testes de detecção de antígenos (HOFMANN-LEHMANN et al., 2001; GOMES-KELLER et al., 2006; TANDON et al., 2008). Outro método derivado como a RT-PCR (*reverse-transcription polymerase chain reaction*), é muito eficaz, visto

que proporciona a identificação das partículas de RNA viral (RAPPOLEE et al., 1988a, 1988b). Nesse contexto, Tandon et al. (2005) recomendaram que a quantificação do RNA viral por PCR (RT-qPCR) nas primeiras semanas após infecção pelo FeLV. Inclusive, poderia detectar a infecção nos casos em que o FeLV se encontra retido em determinados tecidos, quando somente o RNA pode ser encontrado na circulação. Os ensaios que viabilizam a quantificação de cargas provirais de enFeLV, FeLV e RNA viral descritos por Tandon et al., (2008), podem ser aplicados em estudos de vacinação contra FeLV ou ainda na análise de casos clínicos complexos, levando posteriormente a uma compreensão mais clara da patogênese e resultado das infecções por FeLV e a potencial influência das sequências de enFeLV em felinos.

Ademais, um ensaio de nested-PCR (nPCR), demasiadamente sensível foi elaborada e propicia ainda a distinção entre FeLV endógeno e exógeno utilizando pares internos e externos de iniciadores com base na região de repetição do terminal longo U3 (LTR) do provírus FeLV (MIYAZAWA, JARRET, 1997; COELHO et al., 2008).

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

- Realizar estudos da diversidade genética de isolados de FIV e FeLV provenientes do GenBank e validar métodos de PCR em tempo real para detecção e quantificação desses retrovírus em Caxias do Sul/RS.

3.2. Objetivos específicos

- Realizar estudos *in silico* da diversidade genética de FIV e FeLV.
- Projetar e validar ensaios para detecção molecular de FIV e FeLV em gatos domésticos.
- Estabelecer procedimentos de determinação de viremia de FIV e FeLV em gatos domésticos.

4. Resultados

A presente dissertação está organizada em dois capítulos com a inclusão de dois manuscritos.

CAPÍTULO I: Manuscrito intitulado “*Feline immunodeficiency virus phylogenetic classification*”, submetido para publicação na revista *Acta Scientiae Veterinariae*. <https://www.ufrgs.br/actavet/>

CAPÍTULO II: Manuscrito “**Quantitative polymerase chain reaction assays for detection and viral load determination of feline retroviruses in domestic cats from South Brazil**”, a ser submetido para publicação em revista internacional.

Acta Scientiae Veterinariae
RESEARCH ARTICLE

***Feline immunodeficiency virus* Phylogenetic Classification**

Diezza Biondo¹², Jessica Gomes Maciel¹², Diéssy Kipper³, Weslei de Oliveira Santana¹², André

Felipe Streck¹², Vagner Ricardo Lunge¹²³

¹Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul (UCS), Caxias do Sul, RS, Brazil. ²Laboratório de Diagnóstico em Medicina Veterinária, Universidade de Caxias do Sul (UCS), Caxias do Sul, RS, Brazil. ³Simbios Biotecnologia, Cachoeirinha, RS, Brazil. CORRESPONDENCE: D. Kipper [diessykipper@hotmail.com – Tel +55 (51) 30747400]. Simbios Biotecnologia. Rua Caí, 541, Bairro Vila Princesa Izabel, CEP 94940-030 Cachoeirinha, RS Brazil.

ABSTRACT

Background: The feline immunodeficiency virus (FIV) is responsible for a retroviral disease that affects domestic and wild cats worldwide, causing Feline Acquired Immunodeficiency Syndrome (FAIDS). FIV is a lentivirus from the family *Retroviridae* and its genome has three main structural genes: *gag*, *pol* and *env*. Phylogenetic studies have classified FIV into seven subtypes according to the diversity among strains from the World, mainly in the *env* gene. Epidemiological analyses have demonstrated the high predominance of FIV-A and FIV-B. This *in silico* study aimed to perform a phylogenetic analysis to study FIV diversity worldwide.

Materials, Methods , Results: A total of 60 whole genome sequences (WGS) and 122 FIV *env* gene sequences were included in two datasets, which were aligned using MAFFT version 7. Recombination among genomes and/or *env* genes was analyzed with RDP5 software. Phylogenetic analyzes with both datasets were performed, after removing the recombinant sequences, by the W-IQ-TREE and constructed and edited by the FigTree. A total of 12 recombination events involving 19 WGS were detected. In addition, 27 recombination events involving 49 sequences were observed in the *env* gene. A high rate of recombinants was observed inter-subtypes (A/B and B/D) and intra-subtypes (A/A). All recombinants were removed from the subsequent phylogenetic analyses. Phylogenies demonstrated six distinct main clades, five from domestic cats (A, B, C, E, U) and one

from wild cat sequences (W) in the WGS, as well as in the specific *env* gene analyses. Most clustered with subtype B sequences. In the WGS analysis, clade B had a prevalence of 65.9% Brazilian sequences (27/41) and 2.4% Japanese sequences (1/41). In the *env* gene analyses, clade B showed a prevalence of 43.8% of Brazilian sequences (32/73) and 20.5% of USA sequences (15/73). The results of both analyzes also confirm the FIV-wide geographical distribution around the world. In the phylogenetic analyzes carried out with WGS, sequences from China (1/41; 2.4%), Colombia (1/41; 2.4%) and the USA (1/41; 2.4%) were identified in clade A; sequence from Canada in clade C (1/41; 2.4%); sequence from Botswana belonged to clade E (1/41; 2.4%); sequences from Brazil clustered into clade U (2/41; 5% - data not yet published); and sequences belonging to the clade W were from Canada (1/41; 2.4%) and the USA (5/41; 12.3%). Specific *env* gene phylogenetic analyses showed sequences from Colombia (1/73; 1.4%), France (2/73; 2.7%), the Netherlands (3/73; 4.1%), Switzerland (2/73; 2.7%), EUA (6/73; 8.3%), belonging to clade A; sequence from Canada belonging to clade C (1/73; 1.4%); sequences from Brazil belonging to clade U (2/73; 5% - data not yet published); and sequences belonging to clade W from the USA (6/73; 8.3%).

Discussion: The results presented here demonstrate that FIV has a rapid viral evolution due to recombination and mutation events, more specifically in the *env* gene, which is highly variable. Currently, this retrovirus is classified into seven subtypes (A, B, C, D, E, F and U-NZenv) according to their high genomic diversity. It also highlighted the importance of *in silico* sequence and phylogeny studies to demonstrate evolutionary processes. This was the first study to address the WGS FIV diversity with a phylogenetic approach.

Keywords: FIV, *in silico*, phylogeny, subtypes, recombination.

INTRODUCTION

Feline Immunodeficiency Virus (FIV) is from the family *Retroviridae* [25]. It causes domestic and wild feline progress infections to Feline Acquired Immune Deficiency Syndrome (FAIDS) [17]. The FIV genome comprises three main structural genes: *gag*, *pol* and *env*. The *gag* gene encodes

internal structural proteins (matrix; capsid and nucleocapsid). The *pol* gene codifies the viral polymerase (reverse transcriptase; protease; integrase; dUTPase). The *env* gene encodes surface and transmembrane glycoproteins. The FIV genome has also other accessory and regulatory genes. The *env* gene is the most variable and the main determinant of antigenic diversity [15].

FIV evolution occurs due to recombination and mutation events [9]. Currently, it is classified into seven subtypes (A, B, C, D, E, F and U-NZenv) according to genomic diversity [4,26,40]. Epidemiological studies have demonstrated the predominance of FIV-A and FIV-B worldwide. FIV-C was described in North America, Asia and Oceania, while FIV-D was detected only in Asian countries. FIV-E seems to occur in Central / South America and Asia, FIV-F in North America, Europe and Oceania, and FIV U-NZenv in New Zealand [7,8,10,35]. This study aimed to evaluate FIV diversity based on *in silico* analyses of WGS and *env* gene sequences through a phylogenetic approach.

MATERIALS AND METHODS

Dataset

A total of 60 whole genome sequences (WGS) and 62 *env* gene sequences FIV were included in the dataset. All WGS and complete *env* genes were downloaded from the GenBank - National Center for Biotechnology Information (NCBI) (Supplementary file: Table 1 and Table 2). The terms “complete genome”, “genome”, “envelope”, “complete cds” and “feline immunodeficiency virus” were used in the search strategy, and only sequences with three main information (host, country, and year of isolation) were included in each dataset. Clonal sequences were not included. From the 60 WGS, the whole *env* region was extracted using Geneious version 2021.2.2 (Biomasters, www.geneious.com), and added to the *env* dataset, totaling 122 *env* gene sequences. WGS and *env* gene alignments were generated using MAFFT version 7 [14].

Recombinant sequence analysis

To verify the existence of possible recombinant genomes and/or a more specific recombinant event in the *env* gene, both alignments were analyzed with the RDP5 software [20], which applies different methods of recombination and analysis in a set of data. In this research, data were analyzed using the following recombination methods: RDP, GENECONV, BootScan, MaxChi, Chimaera, SiScan and 3Seq [41]. The beginning and end breakpoints of the potential recombinant sequences were defined by the RDP5 software. Recombinant events were considered significant when $p \leq 0.01$ was observed for the same event using four or more algorithms [20].

Phylogenetic analysis

Phylogenetic analyses with both datasets were performed after recombinant events sequence removal. The phylogenetic relationships were inferred using the maximum likelihood (ML) method with 1000 replicates of the ultrafast bootstrap approximation and the optimal nucleotide substitution model selected using ModelFinder implemented in the W-IQ-TREE web server [37]. The FigTree program was used to construct and edit the phylogenetic trees (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

RESULTS

A total of 12 WGS recombination events were detected by RDP5 (Supplementary file: Table 3). Among these events, 19 sequences were involved and were removed from the phylogenetic analyses. Most of the events in WGS (75%) occurred between wild-type host sequences in similar regions of the genome, end of *pol*, ORF1, ORF2 and *env* gene (Figure 1). Furthermore, it was possible to verify recombination between subtype A (M36968 and X57002), between subtype B (MW142032, MW142028, MW142047, MW815634, MW815633) and between wild-type host and subtype B (EU117991, EF455614, MW142039, AY713445, EF455609, U11820), sequences. The EF455610 wild-type host strain was present in five recombination events, it appeared with the highest frequency (Supplementary file: Table 3).

A total of 27 *env* gene recombination events were detected by RDP5 (Supplementary file: Table 4). Among the *env* gene events, 49 sequences were involved. D37815 subtype D sequence was recombinant and had the major parent D37811 subtype D and minor parent D37817 subtype B, all sequences from Japan. Sequence D37814 subtype B (from Japan) was recombinant and had the major parent KP264478 (from EUA) and minor parent D37811 subtype D (from Japan). Sequence D37816 subtype B was recombinant and had the major parent D37817 subtype B and minor parent D37815 subtype D, all from Japan. Consequently, these events show the occurrence of recombination between subtypes B and D in Japan. Besides, sequence EU117992 subtype E was a minor parent of the recombinant sequences AY13445 (wild-type host) and EU117991 subtype B (Figure 2). Recombination events between wild-host sequences (EF455610, EF455609, EF455607, EF455611, EF455608, EF455612, EF455613) were also found. The L00608 subtype A strain was present in five recombination events, it appeared with the highest frequency (Supplementary file: Table 4).

Of the initial 60 WGSs, only 41 remained in the study because the recombinant sequences were removed. All 41 WGSs sequences were comparatively analyzed and they could be classified into six well-separated clades in the phylogenetic tree. Four clades were composed by WGS from the corresponding subtypes: FIV-A (n = 3), FIV-B (n = 28), FIV-C (n = 1) and FIV-E (n = 1). The remaining genomes clustered into two clades: U (n = 2), and W (wild-type host; n = 6) (Figure 3). Clade A was composed of genomes from China (1/41; 2.4%), Colombia (1/41; 2.4%) and the USA (1/41; 2.4%); clade B was composed of 28 sequences from Brazil (27/41; 65.9%) and Japan (1/41; 2.4%); clade C was composed by one genome from Canada (1/41; 2.4%); clade E was composed by one genome from Botswana (1/41; 2.4%). Clade U was composed of two genomes from Brazil (2/41; 5%); and clade W was composed of six genomes from Canada (1/41; 2.4%) and the USA (5/41; 12.3%).

Of the initial 122 *env* gene sequences, only 73 remained because the recombinant sequences were removed from the study. All 73 *env* gene sequences were comparatively analyzed and they could be classified into five well-separated clades in the phylogenetic tree. Three clades were composed of

env gene sequences from the corresponding subtypes: FIV-A (n = 15), FIV-B (n = 47) and FIV-C (n = 1). The remaining *env* gene sequences clustered into two clades: U (n = 2), and W (wild-type host; n = 6) (Figure 4). Clade A was composed of *env* sequences from Colombia (1/73; 1.4%), France (2/73; 2.7%), Netherlands (3/73; 4.1%), Switzerland (2/73; 2.7%), USA (6/73; 8.3%); clade B was composed by *env* gene sequences from Brazil (32/73; 43.8%) and EUA (15/73; 20.5%); clade C was composed by one *env* sequence from Canada (1/73; 1.4%); clade U was composed by two sequences from Brazil (2/73; 2.7%); and six *env* sequences were clustered in clade W from the USA (6/73; 8.3%). Two sequences (2/73; 2.7%) from the USA (KP264341 and KP264436) did not cluster into clades.

In the phylogenies (WGS and *env* gene) it was possible to verify the genetic evolutionary difference between the wild-type and domestic cats by the formation of different clades, and the formation of clusters for almost all the FIV subtypes already described (A, B, C, E, U, W).

DISCUSSION

This study evaluated the FIV diversity based on *in silico* analyses of WGS and *env* gene sequences through a phylogenetic approach. The WGS FIV recombinants analysis showed intra-subtype recombination between subtype A (M36968 and X57002) and between subtype B (MW142032, MW142028, MW142047, MW815634, MW815633). There are few reports describing these events, which makes it impossible to know the degree of viral diversity of this type of recombination [30]. Hayward , Rodrigo [9] highlight the difficulty of detecting intra-subtype recombination given the high similarity of the sequences, making this type of event go unnoticed. Although less observed, intra-subtype recombination has also been reported in other lentiviruses (HIV) [16,18]. Other recombination events are reported in the study by Pecon-Slattery *et al.* [24] between subtypes A and B in wild cats, corroborating the results found in this study.

In the recombinant analysis of the *env* gene, the events were found mainly between the sequences of subtypes B (D37814 and D37817) and D (D37815 and D37811), from Japan, having

the most expressive events, and reinforce the existence of inter-subtype recombination between B/D corroborating a study by Bachmann *et al.* [1], which also demonstrated this occurrence. Recombination between lentivirus genomes was demonstrated in HIV-1 and HIV-2, which circulated simultaneously in different geographic regions [27,29]. These events between B/D also confirm this hypothesis, since the recombination of most sequences is from Japan. The analysis of two Japanese isolates by Kakinuma *et al.* [13] also suggests that limited similarities in some possible regions of the subtypes may indicate a recombination between these isolates that occurred during the co-infection of a cat.

The specific branching found for wild-type and subtype E (EU117992) *env* gene can be justified as it likely reflects cross-line recombination in nature [24], as it is more closely related to domestic cats than the other wild lineages (AY713445 and EU117991 - subtype B). The wild-type host sequences EF455610, EF455609, EF455607, EF455611, EF455608, EF455612 and EF455613 also showed recombination events, in both analyses (WGS and *env* gene). A study by Bruen, Poss [3] reported that three lineages were derived from recombination events (EF455611, EF455609/EF455610 and EF455613/EF455614). They highlight that the ancestral sequences EF455607/EF455608 were involved in all recombination events that resulted in EF455611, EF455609/EF455610 and EF455613/EF455614 strains, making them important precursors of the viruses that are circulating. Possibly this can explain the fact that sequence EF455610 showed the highest number of recombination events (5/12) in the analysis performed with WGS. On the other hand, in the analysis of the *env* gene, the L00608 subtype A strain appeared more frequently (5/27) in recombination events. The events presented here are derived from lineages from two mid-distance geographic regions (Greater Yellowstone Ecosystem and Wyoming), which indicate that individuals were infected by an ancestral virus that was geographically close in the recent past [3].

It was possible to observe the classification of almost all FIV subtypes in clades, both in the phylogeny of the WGS and in the *env* gene. Thus, there was the formation of six distinct clades: clades A-C, clade E, clade U and clade W. The results confirm previous studies that showed subtypes

A and B to be the most common and prevalent worldwide [10,30]. Studies carried out in northern and western Europe, which include France, the Netherlands and Switzerland, reinforce the results found in the study reporting the dominance of subtype A [28,32]. Previous studies carried out in Canada and the west coast of the USA also corroborate our study results and report the prevalence of clade A [26,38]. It was not possible to observe the formation of a clade for subtype D because the sequences included in this study of this subtype were removed due to recombination. It was also not possible to observe clade formation for subtype F because there are no WGS or complete *env* gene sequences available, only partial sequences that were not included in this study. Thus, the importance of sequencing the complete genome of the pathogens of interest is also highlighted. Many studies are still carried out with only partial sequences of the selected region of the genome [6,11,23,28].

Brazil had an expressive number of sequences grouped in clade B both in the WGS analysis and in the *env* gene ($n = 27$ and $n = 32$, respectively). This corroborates the findings of studies carried out in the southeast region [5,21,35], the midwest region [19], the south region [4] and the northeast region [36], which reported subtype B as predominant in the country until the moment. Only one study reports one case of subtype A circulating in the northeast of Brazil [22]. The USA was the second country to cluster more sequences in clade B in the analysis of the *env* gene ($n = 15$). Other studies carried out in the country previously showed the circulation of this subtype on the East Coast [38], in the state of Texas [39], and in the states of Tennessee and Illinois [2]. The sequences grouped in the clade U, from Brazil, have not yet had their data published in an article so there could be some explanation for the possibility of the existence of the subtype in circulation in the country.

Although there are already studies analyzing regions of the *pol* gene [33,34], accessory genes such as *vif* [17], and especially the *gag* gene, as this gene allows the supply of relevant data for recombination and the general similarity of FIV isolates with vaccine strains [12,23,28], the *env* gene is under pressure from the humoral immune response, generating positive exhaustion mutation selection. This results in a lot of sequence variability, especially in variable loops [28,31]. Therefore, the *env* gene has the highest level of recombination [9]. Thus, historically, nucleotide sequences from

the V3-V5 region of the *env* gene have been widely used in the genetic subtyping of FIV strains, as well as in molecular epidemiological studies [30]. And because of these factors, the *env* gene was chosen to be the focus of this study, rather than the other genes. Despite the determination of the *env* gene as the best region to be evaluated, due to the high rate of variation [9], this study analyzes complete genomic sequences.

CONCLUSION

The FIV recombination analysis showed the occurrence of several recombinant events between sequences, reinforcing the occurrence of this event in FIV genome evolution. It was possible to observe a high rate of recombinants, mainly intra-subtypes as observed in this study (A/B and B/D), and also inter-subtypes (A/A), which lead to great genetic diversity. The phylogenetic analysis demonstrated six different clades (A, B, C, E, U, W). These results reiterate the importance of *in silico* sequence and phylogeny studies to clarify evolutionary genetics as well as circulating variants using WGS and *env* gene.

Funding

This work was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES), process number: 88887.571689/2020-00.

Acknowledgments

We offer our thanks to the University of Caxias do Sul, which provided technical support for this article, and the laboratories that shared the data through the NCBI/GenBank, on which this research is based.

Declaration of Interest

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

- 1 Bachmann M.H., Mathiason-Dubard C., Learn G.H., Rodrigo A.G., Sodora D.L., Mazzetti P., Hoover E.A. , Mullins J.I. 1997.** Genetic diversity of feline immunodeficiency virus: dual infection, recombination, and distinct evolutionary rates among envelope sequence clades. *Journal of Virology*. 71(6): 4241–4253.
- 2 Bęczkowski P.M., Hughes J., Biek R., Litster A., Willett B.J. , Hosie M.J. 2014.** Feline immunodeficiency virus (FIV) env recombinants are common in natural infections. *Retrovirology*. 11: 80.
- 3 Bruen T.C. , Poss M. 2007.** Recombination in feline immunodeficiency virus genomes from naturally infected cougars. *Virology*. 364(2): 362–370.
- 4 Cano-Ortiz L., Junqueira D.M., Comerlato J., Costa C.S., Zani A., Duda N.B., Tochetto C., Dos Santos R.N., da Costa F.V.A., Roehle P.M. , Franco A.C. 2017.** Phylodynamics of the Brazilian feline immunodeficiency virus. *Infection, Genetics and Evolution : Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*. 55: 166–171.
- 5 Caxito F.A., Coelho F.M., Oliveira M.E. , Resende M. 2006.** Feline immunodeficiency virus subtype B in domestic cats in Minas Gerais, Brazil. *Veterinary Research Communications*. 30(8): 953–956.
- 6 Duarte A. , Tavares L. 2006.** Phylogenetic analysis of Portuguese Feline Immunodeficiency Virus sequences reveals high genetic diversity. *Veterinary Microbiology*. 114(1–2): 25–33.
- 7 Elder J.H., Lin Y.-C., Fink E. , Grant C.K. 2010.** Feline immunodeficiency virus (FIV) as a model for study of lentivirus infections: parallels with HIV. *Current HIV Research*. 8(1): 73–80.
- 8 Hartmann K. 2012.** Clinical aspects of feline retroviruses: a review. *Viruses*. 4(11): 2684–2710.
- 9 Hayward J.J. , Rodrigo A.G. 2008.** Recombination in feline immunodeficiency virus from feral and companion domestic cats. *Virology Journal*. 5: 76.
- 10 Hosie M.J., Addie D., Belák S., Boucraut-Baralon C., Egberink H., Frymus T., Gruffydd-Jones T., Hartmann K., Lloret A., Lutz H., Marsilio F., Pennisi M.G., Radford A.D., Thiry E.,**

- Truyen U. , Horzinek M.C. 2009.** Feline immunodeficiency. ABCD guidelines on prevention and management. *Journal of Feline Medicine and Surgery*. 11(7): 575–584.
- 11 Huguet M., Novo S.G. , Bratanich A. 2019.** Detection of feline immunodeficiency virus subtypes A and B circulating in the city of Buenos Aires. *Archives of Virology*. 164(11): 2769–2774.
- 12 Iwata D. , Holloway S.A. 2008.** Molecular subtyping of feline immunodeficiency virus from cats in Melbourne. *Australian Veterinary Journal*. 86(10): 385–389.
- 13 Kakinuma S., Motokawa K., Hohdatsu T., Yamamoto J.K., Koyama H. , Hashimoto H. 1995.** Nucleotide sequence of feline immunodeficiency virus: classification of Japanese isolates into two subtypes which are distinct from non-Japanese subtypes. *Journal of Virology*. 69(6): 3639–3646.
- 14 Katoh K. , Standley D.M. 2013.** MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution*. 30(4): 772–780.
- 15 Kenyon J.C. , Lever A.M.L. 2011.** The molecular biology of feline immunodeficiency virus (FIV). *Viruses*. 3(11): 2192–2213.
- 16 Kiwelu I.E., Novitsky V., Margolin L., Baca J., Manongi R., Sam N., Shao J., McLane M.F., Kapiga S.H. , Essex M. 2013.** Frequent intra-subtype recombination among HIV-1 circulating in Tanzania. *PloS One*. 8(8): e71131.
- 17 Koç B.T. , Oğuzoğlu T.Ç. 2020.** A phylogenetic study of Feline Immunodeficiency Virus (FIV) among domestic cats in Turkey. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 73: 101544.
- 18 Lau K.A. , Wong J.J.L. 2013.** Current Trends of HIV Recombination Worldwide. *Infectious Disease Reports*. 5(Suppl 1): e4.
- 19 Marçola T.G., Gomes C.P.C., Silva P.A., Fernandes G.R., Paludo G.R. , Pereira R.W. 2013.** Identification of a novel subtype of feline immunodeficiency virus in a population of naturally infected felines in the Brazilian Federal District. *Virus Genes*. 46(3): 546–550.

- 20 Martin D.P., Varsani A., Roumagnac P., Botha G., Maslamoney S., Schwab T., Kelz Z., Kumar V. , Murrell B. 2021.** RDP5: a computer program for analyzing recombination in, and removing signals of recombination from, nucleotide sequence datasets. *Virus Evolution*. 7(1): veaa087.
- 21 Martins A.N., Medeiros S.O., Simonetti J.P., Schatzmayr H.G., Tanuri A. , Brindeiro R.M. 2008.** Phylogenetic and genetic analysis of feline immunodeficiency virus gag, pol, and env genes from domestic cats undergoing nucleoside reverse transcriptase inhibitor treatment or treatment-naïve cats in Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Virology*. 82(16): 7863–7874.
- 22 Martins N.D.S., Rodrigues A.P. de S., da Luz L.A., Dos Reis L. da L., de Oliveira R.M., de Oliveira R.A., Abreu-Silva A.L., Dos Reis J.K.P. , Melo F.A. 2018.** Feline immunodeficiency virus subtypes B and A in cats from São Luis, Maranhão, Brazil. *Archives of Virology*. 163(2): 549–554.
- 23 Muz D., Can H., Karakavuk M., Döşkaya M., Özdemir H.G., Değirmenci Döşkaya A., Atalay Şahar E., Pektaş B., Karakuş M., Töz S., Özbel Y., Gürüz A.Y. , Muz M.N. 2021.** The molecular and serological investigation of Feline immunodeficiency virus and Feline leukemia virus in stray cats of Western Turkey. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 78: 101688.
- 24 Pecon-Slattery J., Troyer J.L., Johnson W.E. , O'Brien S.J. 2008.** Evolution of feline immunodeficiency virus in Felidae: implications for human health and wildlife ecology. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 123(1–2): 32–44.
- 25 Pedersen N.C., Ho E.W., Brown M.L. , Yamamoto J.K. 1987.** Isolation of a T-lymphotropic virus from domestic cats with an immunodeficiency-like syndrome. *Science (New York, N.Y.)*. 235(4790): 790–793.
- 26 Reggeti F. , Bienzle D. 2004.** Feline immunodeficiency virus subtypes A, B and C and intersubtype recombinants in Ontario, Canada. *The Journal of General Virology*. 85(Pt 7): 1843–1852.
- 27 Robertson D.L., Hahn B.H. , Sharp P.M. 1995.** Recombination in AIDS viruses. *Journal of*

Molecular Evolution. 40(3): 249–259.

28 Roukaerts I.D.M., Theuns S., Taffin E.R.L., Daminet S., Nauwynck H.J. 2015.

Phylogenetic analysis of feline immunodeficiency virus strains from naturally infected cats in Belgium and The Netherlands. *Virus Research*. 196: 30–36.

29 Sabino E.C., Shpaer E.G., Morgado M.G., Korber B.T., Diaz R.S., Bongertz V., Cavalcante

S., Galvão-Castro B., Mullins J.I., Mayer A. 1994. Identification of human immunodeficiency virus type 1 envelope genes recombinant between subtypes B and F in two epidemiologically linked individuals from Brazil. *Journal of Virology*. 68(10): 6340–6346.

30 Samman A., McMonagle E.L., Logan N., Willett B.J., Biek R., Hosie M.J. 2011.

Phylogenetic characterisation of naturally occurring feline immunodeficiency virus in the United Kingdom. *Veterinary Microbiology*. 150(3–4): 239–247.

31 Seibert S.A., Howell C.Y., Hughes M.K., Hughes A.L. 1995. Natural selection on the gag, pol, and env genes of human immunodeficiency virus 1 (HIV-1). *Molecular Biology and Evolution*. 12(5): 803–813.

32 Steinrigl A., Ertl R., Langbein I., Klein D. 2010. Phylogenetic analysis suggests independent introduction of feline immunodeficiency virus clades A and B to Central Europe and identifies diverse variants of clade B. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 134(1–2): 82–89.

33 Szilasi A., Dénes L., Krikó E., Heenemann K., Ertl R., Mándoki M., Vahlenkamp T.W., Balka G. 2019. Prevalence of feline immunodeficiency virus and feline leukaemia virus in domestic cats in Hungary. *JFMS Open Reports*. 5(2): 2055116919892094.

34 Szilasi A., Dénes L., Krikó E., Murray C., Mándoki M., Balka G. 2021. Prevalence of feline leukaemia virus and feline immunodeficiency virus in domestic cats in Ireland. *Acta Veterinaria Hungarica*. 68(4): 413–420.

35 Teixeira B.M., Logan N., Samman A., Miyashiro S.I., Brandão P.E., Willett B.J., Hosie M.J., Hagiwara M.K. 2011. Isolation and partial characterization of Brazilian samples of feline immunodeficiency virus. *Virus Research*. 160(1–2): 59–65.

- 36 Teixeira B.M., Taniwaki S.A., Menezes P.M.M., Rodrigues A.K.P.P., Mouta A.N., Arcebispo T.L.M., Braz G.F., da Cruz J.C.M., Brandão P.E., Heinemann M.B., Silva M.X. , Hosie M.J. 2019.** Feline immunodeficiency virus in Northern Ceará, Brazil. *JFMS Open Reports*. 5(2): 2055116919859112.
- 37 Trifinopoulos J., Nguyen L.-T., von Haeseler A. , Minh B.Q. 2016.** W-IQ-TREE: a fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis. *Nucleic Acids Research*. 44(W1): W232-5.
- 38 Weaver E.A. 2010.** A detailed phylogenetic analysis of FIV in the United States. *PloS One*. 5(8): e12004.
- 39 Weaver E.A., Collisson E.W., Slater M. , Zhu G. 2004.** Phylogenetic analyses of Texas isolates indicate an evolving subtype of the clade B feline immunodeficiency viruses. *Journal of Virology*. 78(4): 2158–2163.
- 40 Westman M.E., Coggins S.J., van Dorsselaer M., Norris J.M., Squires R.A., Thompson M. , Malik R. 2022.** Feline immunodeficiency virus (FIV) infection in domestic pet cats in Australia and New Zealand: Guidelines for diagnosis, prevention and management. *Australian Veterinary Journal*. 100(8): 345–359.
- 41 Yang H., Peng Q., Lang Y., Du S., Cao S., Wu R., Zhao Q., Huang X., Wen Y., Lin J., Zhao S. , Yan Q. 2022.** Phylogeny, Evolution, and Transmission Dynamics of Canine and Feline Coronaviruses: A Retro-Pro prospective Study. *Frontiers in Microbiology*. 13: 850516.

LEGENDS AND FIGURES

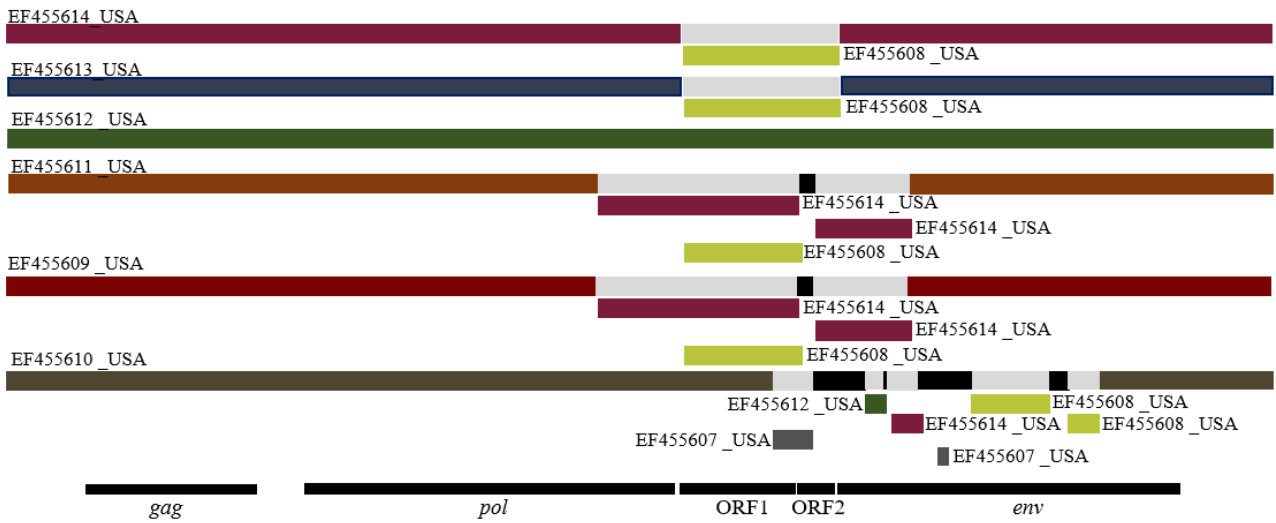


Figure 1 – Shows the main recombination site in wild-host sequences of the WGS dataset. The *gag*, *pol* and *env* genes; ORF1 and ORF2 are identified at the bottom of the figure. Different colors (colored by software RDP5) denote recombinant segments in sequences and show their non-recombinant segments.

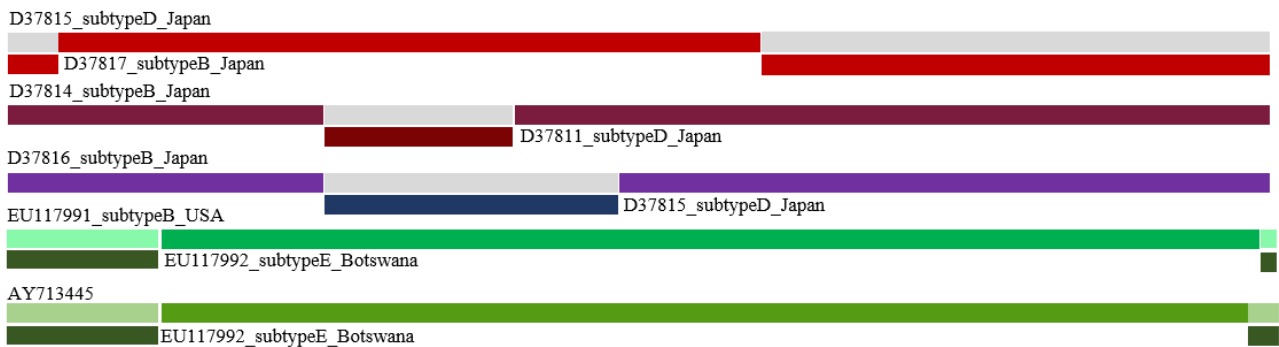


Figure 2 – Shows the main recombinant sites between subtypes B, D and E of the *env* dataset. Different colors (colored by software RDP5) denote recombinant segments in sequences and show their non-recombinant segments.

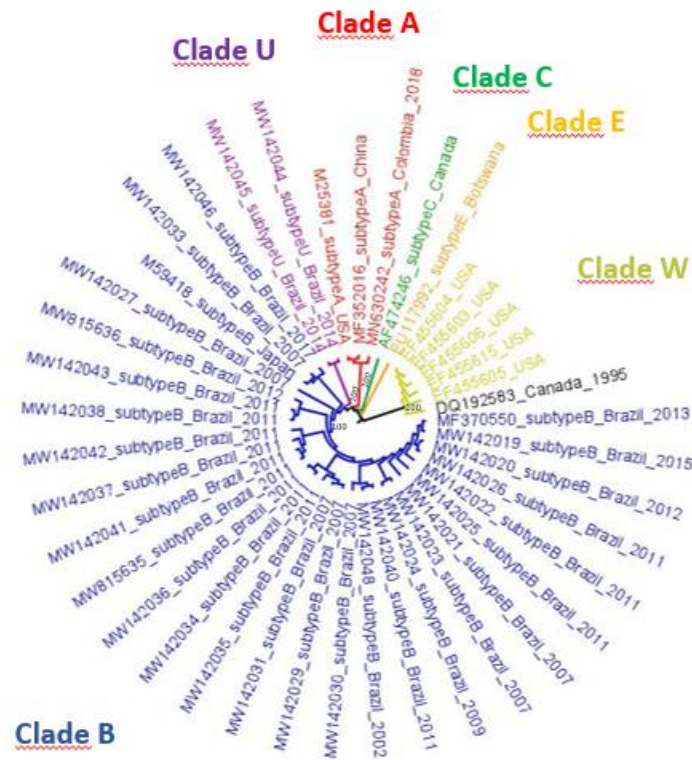


Figure 3 – Phylogenetic tree based on 41 WGS. Red labels are Clade A (subtype A); blue labels are Clade B (subtype B); green labels are Clade C (subtype C); orange labels are Clade E (subtype E); purple labels are Clade U (subtype U); and yellow labels are Clade W (wild-host). The evolutionary history was inferred by maximum likelihood, with 1000 bootstrap replicates. The main bootstraps are present in the nodes.

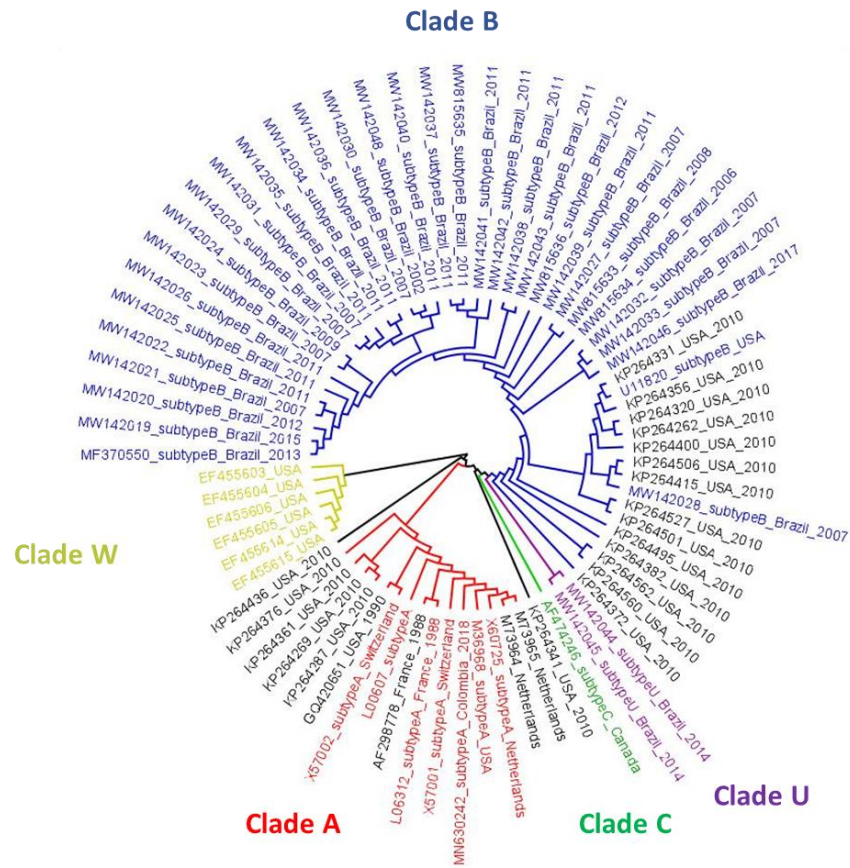


Figure 4 – Phylogenetic tree based on 73 *env* gene sequences. Red labels are Clade A (subtype A); blue labels are Clade B (subtype B); green labels are Clade C (subtype C); purple labels are Clade U (subtype U); and yellow labels are Clade W (wild-host). The evolutionary history was inferred by maximum likelihood, with 1000 bootstrap replicates. The main bootstraps are present in the nodes.

Supplementary file - Table 1: WGS dataset of 60 complete FIV genome sequences downloaded from Genbank; Table 2: *env* gene dataset of the 62 complete FIV sequences; Table 3: Results of the recombinant WGS FIV sequences, subsequently removed from the phylogenetic study; Table 4: Results of the recombinant complete *env* gene FIV sequences, subsequently removed from the phylogenetic study. (Link in anexus).

CAPÍTULO II: Manuscrito “**Quantitative polymerase chain reaction assays for detection and viral load determination of feline retroviruses in domestic cats from South Brazil**”, a ser submetido para publicação em revista internacional.

Quantitative polymerase chain reaction assays for detection and viral load determination of feline retroviruses in domestic cats from South Brazil

Diezza Biondo¹², Jessica Gomes Maciel¹², Weslei de Oliveira Santana¹², Diéssy Kipper¹², André Felipe Streck, Nilo Ikuta³, André S. K. Fonseca³, Vagner Ricardo Lunge¹²³

¹ Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul (UCS), Caxias do Sul, RS, Brazil

² Laboratório de Diagnóstico em Medicina Veterinária, Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, RS, Brazil

³ Simbios Biotecnologia, Cachoeirinha, RS.

Abstract

Two main feline retroviruses (FIV, *Feline leukemia virus* and FeLV, *Feline immunodeficiency virus*) cause severe infections that affect wild and domestic cats worldwide. Molecular biology assays, highlighting polymerase chain reaction (PCR), are necessary for FIV and FeLV detection and quantitation. This study aimed to validate quantitative PCR (qPCR) assays for the detection and viral load determination of FIV and FeLV in domestic cats from South Brazil. Blood samples from 100 domestic cats previously analyzed with immuno-chromatographic (IC) rapid tests were obtained by convenience in veterinary clinics. FIV and FeLV qPCRs oligonucleotides and conditions were defined by *in silico* analyses. Both qPCRs were also adjusted for provirus DNA detection and quantitation using synthetic DNA controls. FIV and FeLV qPCRs were carried out with all blood samples. The results demonstrated that qPCR assays for FIV and FeLV quantitation had an excellent linearity ($R^2 > 0.99$), with a dynamic quantitation range from 10 to 10^6 DNA copies / ml. The comparative analyses with IC results of 100 blood samples demonstrated a good correlation with Kappa values of 0.7 and 0.4 for FIV and FeLV qPCR detection analyses, respectively. In addition, all positive samples could be quantified in a wide range of viral loads. These results demonstrated the effective validation of methods for the detection and quantification of FIV and FeLV.

Keywords: PCR assay, *in silico* analysis, quantification, FIV, FeLV.

Introduction

Feline immunodeficiency virus (FIV) and Feline leukemia virus (FeLV) are from the family *Retroviridae*. They cause two concerning infectious diseases in domestic and wild cats worldwide (Hartmann, 2012; Bande et al., 2012; Little et al., 2020). FIV induces feline-acquired immunodeficiency syndrome (FAIDS), which increases the risk of opportunistic infections, neurological diseases and tumors (Hartmann, 2012). FeLV causes tumor development, bone marrow suppression syndromes and several secondary infectious diseases (Hartmann, 2012; Sykes and Hartmann, 2013; Helfer-Hungerbuehler et al., 2015).

These retroviruses can be easily disseminated among domestic and wild cats. FIV is transmitted mainly by bites, due to the inoculation of viral particles present in the saliva or blood of infected animals (Hosie et al., 2009; Westman et al., 2022). FeLV is also transmitted through saliva, blood and other body fluids by close contact with infected cats and even from the infected female to her kittens before birth or during nursing (Vobis et al., 2003; Cano-Ortiz et al., 2022).

Immunological and molecular biology methods have been useful in routine laboratory diagnostic procedures to detect these viruses. Laboratory immunoassays based on enzyme immunoassay (ELISA), antibody immunofluorescence (IFA) and western blot techniques were first used in the analysis of whole blood, serum or plasma. Recently, rapid tests or point of care, based on rapid immune migration (RIM) have been increasingly used in clinical routines due to their practicality (Little et al., 2020).

DNA and/or RNA of these viruses can also be analyzed by different molecular biology methods (Westman et al., 2019). These assays, highlighting PCR, have high specificity and sensitivity (Levy et al., 2017; Lacharoje; Techangamsuwan; Chaichanawongsaroj, 2021). Quantitative PCR (qPCR) assays are also important to determine the viral loads and to define the clinical condition of the infection (Little et al., 2020). This study aimed to evaluate and validate qPCR assays for the detection and viral load determination of FIV and FeLV in domestic cats from Brazil.

Materials and methods

1. Animals and samples

The present study was carried out with samples from Caxias do Sul, a city located in the northeast of the state of Rio Grande do Sul, southern Brazil. It was approved by the Ethics Committee on the Use of Animals of the University of Caxias do Sul (CEUA-UCS) under nº006/2022. The following epidemiological variables were obtained from each animal: sex, age, health status, breed, lifestyle, presence or absence of clinical signs, vaccination and castration (Supplementary material 1).

Blood samples from the animals were collected from physically restrained cats using cat-friendly approaches (Rodan et al., 2011), punctured with a needle (20x 0.55mm) in the external jugular vein. Whole blood was distributed in 0.5mL tubes with EDTA, previously identified, refrigerated (± 10 °C) until arrival at the laboratory. Centrifuge (3000 rpm for 5 minutes) was used to separate the blood components (plasma, leukocyte pap and red blood cells); Afterwards, the contents of each phase were separated by manual pipetting, and stored in sealed vials and frozen at (-20 °C) until further processing.

A total of 107 samples were selected from symptomatic or asymptomatic animals. A total of 100 domestic cats had been clinically examined by veterinarians as well as tested by individual immuno-chromatographic assays (rapid tests) SNAP FIV/FelV Combo Test (IDEXX Laboratories, Inc.; Westbrook, Maine, United States).

Overall, the sampling was composed of 43 female and 57 male cats aged from two months to 18 years old. A total of 72 animals showed behavior at the time of collection and 27 were apathetic. Of these animals, 19 showed clinical signs, anemia, anorexia, such as apathy, vomiting, convulsions, jaundice, hyporexia, dyspnea, weakness and locomotor difficulty. Tumors or lymphomas (mediastinum, spleen, renal) were reported in 13 animals. A total of 47 cats were treating traumas or other diseases (fractures, urethral obstruction, urethral obstruction, thyroidism, dermatitis, periodontal disease, keratitis, etc.). In addition, 34 cats did not have free access to the street (17 males and 16 females). The immunization records demonstrated that 68 cats were not vaccinated (38 males and 30 females), while 32 had at least one vaccine (13 females and 19 males). Finally, 31 cats were not castrated (20 males and 11 females), while 69 had been castrated (30 females and 37 males) (Supplementary File 1).

2. *In silico* study of public FIV and FeLV sequences

Primers and probes sets previously described in two PCR assays (Tandon et al., 2005; Wang et al., 2010) were first evaluated by *in silico* analysis, so two genetic sequence datasets (for FeLV and FIV) were constructed. The FIV *gag* gene the unique 3' region (U3) of the long terminal repeat (LTR) of FeLV were the analyzed genetic regions. A total of 60 FIV and 20 FeLV whole genome sequences (WGS), representing main lineages, were downloaded from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) (Supplementary File 2). The datasets were aligned by MAFFT version 7 (Kato et al., 2013) and it was analyzed in Geneious version 2021.2.2 (Biomasters, www.geneious.com).

3. Synthetic DNA construct

One synthetic DNA with the FIV and FeLV (gBlock™ Gene Fragments) was constructed according to previously described instructions (Integrated DNA Technologies, Iowa, USA). This construct had DNA sequences specific for the two genetic targets: FIV *gag* gene and FeLV U3 LTR.

This synthetic DNA construct was firstly used to evaluate the linearity and the limit of detection (LOD) of the assays after serial ten times dilutions (with an initial concentration of 4,000,000 copies).

It was also used to prepare standards samples for quantitation in all assays with the domestic cats blood samples. So five dilutions with specific viral loads (from 40 to 400,000 copies) were used in all qPCR assays. CTs (cycle threshold) in all positive samples were compared with CTs of the standard curve to determine FIV and FeLV loads in positive samples. All results were converted to log₁₀ DNA copies / mL.

4. Limit of detection

The analytical sensitivity of the assays (LOD, limit of detection) was calculated using the PROBIT procedure based on the methodology described by Waldman et al. (2020). In summary, replicates of positive control samples of each pathogen with loads of specific virus DNAs (4.000.000 copies for both viruses) were serially ten times diluted (diluted 10⁵ to 10⁻¹ fold). The procedure was repeated on three different days by the same operator and equipment to evaluate reproducibility, totaling 9 replicates of each dilution. The number of cells of each dilution, the total number of repetitions, and several positive repetitions were used to calculate the 50% and 95% cut-off values, which represented the LOD of the assays. Assessments of possible statistical differences between qualitative variables were verified by Pearson's chi-square test or Fisher's exact test as appropriate. Distributions of quantitative variables were verified by the Kolmogorov-Smirnov test with Lilliefors correction and comparisons between groups were performed by Student's t-test and ANOVA. All analyses were bilateral with a pre-established significance level of 5% alpha error ($p < 0.05$). Data were compiled and analyzed using SPSSR software (23.0 version, Chicago, IL Statistical Package for the Social Sciences).

5. DNA and RNA extraction

DNA from whole blood EDTA and RNA from sterile blood plasma were extracted from samples collected for determination of viral plasma proviral DNA and RNA loads with the NewGene Prep and PreAmp extraction reagent kits (Simbios Biotecnologia, Cachoeirinha, RS, Brazil), according to the manufacturer's instructions.

Briefly, 100 µl of the sample was mixed with 400 µl of PREP lysis buffer and incubated at 58°C for 15 min in the oven. Then, 500 µL was aliquoted into a separate tube and 20 µL of silica

suspension was added and mixed. The tubes were subjected to centrifugation at 8600 rpm for 30 s. The pellet was washed once with 1000 μ L of wash buffer (5M GuSCN and 0.1 M Tris-HCl), once with 150 μ L of wash buffer, twice with 150 μ L of 75% ethanol and once with 150 μ L of absolute ethanol. The silica suspension was dried at 58°C for 15 min. The DNA was eluted with 50 μ L of EL buffer and incubated at 95°C for 5 min, and the solution was separated from the silica particles by centrifugation at 8600 rpm for 3 min.

6. FIV/FeLV qPCR assays

FeLV and FIV real-time PCR assays were performed in a total volume of 30 μ L containing 3 μ L of 10x PCR buffer, 23 μ L of H₂O treated, 0.9 μ L of MgCl₂ (50 mM), 0.08 μ L of deoxynucleotide triphosphate (2.1 mM), 0.04 μ L of each primer (50 μ M) and probe (25 μ M), 0.6 μ L of ROX, 0.20 μ L of Taq DNA polymerase (5 U/ μ L) and 2 μ L of DNA template. The reaction was carried out in a thermocycler program with an initial denaturing step of 95 °C for 3 min and 40 cycles of 95 °C for 15 s, followed by annealing/extension at 60 °C for 60 s. RT-PCR results were considered categorically positive if below the reporting limit of Ct=38. All assays were carried out in a thermocycler Step One Plus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Norwalk, CT).

Quantitative data were obtained using standard samples with pre-defined viral loads. FIV and FeLV virus concentrations were log₁₀-transformed for analysis. The linear range was examined by plotting the data and comparing them to a line of equality. Correlation coefficient calculations and linear regression analyses were performed on scatter plots of log-transformed FIV and FeLV RNA levels using Microsoft Excel (Microsoft Corp., Redmond, WA, USA).

7. Comparison between qPCRs and IC rapid tests

The agreement between FIV and FeLV PCR and IC assays were evaluated by 2x2 contingency tables and calculated with Cohen's kappa (κ) (Feuerman and Miller, 2005).

Results

1. FIV and FeLV qPCR assays implementation

Both qPCR assays were first implemented with the use of the gBlocks™. The results demonstrated a range from less than 40 (1.6 log) to more than 400,000 (5.6 log) copies per reaction with excellent linearity ($R^2 = 0.9975$ for FIV qPCR and $R^2 = 0.998$ for FeLV qPCR) (Supplementary File 3).

The limit of detection was also assessed using dilutions of the synthetic control. Two replicates of each dilution were subjected to the real-time PCR assay. In the real-time PCR analysis, the positive

signal was obtained with the synthetic control (150 bp). All samples with readable Ct showed a specific band of 131bp for FeLV and 164pb for FIV.

In addition, seven samples were also used in a first attempt to detect and quantify FIV and FeLV by qPCRs. The results showed all the were negative for FIV, while four were positive for FeLV (with CTs 14.6, 16.2, 20.6 and 23.5). The viral loads of these four samples were also determined according the synthetic DNA standards: 10.1, 9.7, 8.4 and 6.4 log₁₀ DNA copies / mL.

2. FIV and FeLV proviral DNA detection in blood samples

In the analyses of the 100 samples by qPCRs, the overall results demonstrated 18 and 52 FIV and FeLV positive samples, respectively. There were 38 blood samples negative for FIV and FeLV, 10 positive for FIV and negative for FeLV, 44 positive for FeLV and negative for FIV and 8 positive for the two retroviruses (co-infections).

All these qPCR detection data were compared with IC rapid tests results (Table 1).

Table 1 – Comparative analysis of qPCR and IC rapid tests.

FIV		Rapid test		
		+	-	Total
PCR	+	15	3	18
	-	3	79	82
	Total	18	82	100

FeLV		Rapid test		
		+	-	Total
PCR	+	45	7	52
	-	20	28	48
	Total	65	35	100

3. FIV and FeLV proviral DNA quantitation in blood samples

All FIV and FeLV proviral DNA positive samples were also quantified according CT values and synthetic DNA standards used in the independent runs.

In the FIV analyses, DNA proviral loads ranged from 2.9 (0.5 log₁₀) to 4.466.614 (6.6 log₁₀) copies / mL. In the FeLV analyses, it ranged from 0.2 (-0.6 log₁₀) to 516.477.920 (8.7 log₁₀) copies / mL.

4. Comparison analysis of the detection and quantitation results

In the FIV test, three samples (36, 38, 39) showed a positive result in the RT-PCR assay but showed a negative result in the rapid test. In the RT-PCR assay, these samples had a mean value of 5.6 log₁₀ of viral load (Figure 1A).

In the FeLV test, seven samples (257, 103, 112, 253, 330, 335, 251) showed a positive result in the RT-PCR assay but showed a negative result in the rapid test. In the RT-PCR assay, these samples had a mean value of 0.8 of viral load (Figure 1B).

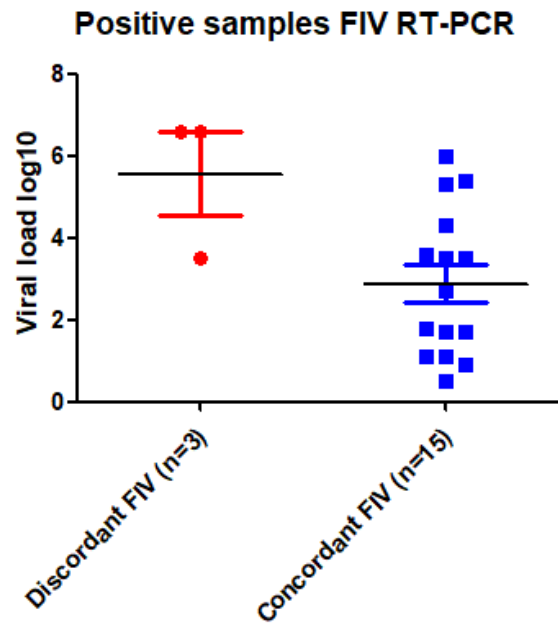


Figure 1A - Viral load (log₁₀) mean of the FIV positive samples RT-PCR. Three samples (red circle) were discordant, which is negative for the rapid test and 15 FeLV samples (blue square) were concordant, which is positive for the rapid test.

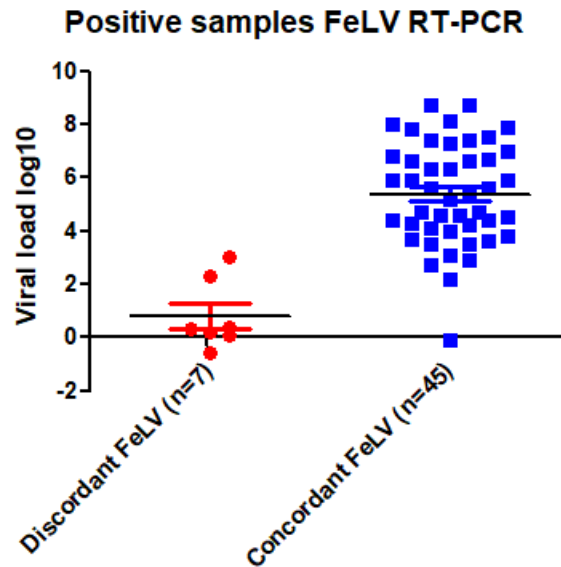


Figure 1B – Viral load (log₁₀) mean of the FeLV positive samples RT-PCR. Seven samples (red circle) were discordant, which is negative for the rapid test and 45 FeLV samples (blue square) were concordant, which is positive for the rapid test.

Discussion

FIV and FeLV are two very concerning pathogens affecting domestic and wild cats worldwide. They cause feline syndromes resulting in opportunistic infections, neurological diseases and tumors (Hartmann, 2012; Hartmann, 2012; Sykes and Hartmann, 2013; Helfer-Hungerbuehler et al., 2015). Different diagnostic procedures are necessary to detect these retroviral infections as well as to determine viral loads for more definitive clinical prognostic (Hartmann and Hofmann-Lehmann, 2020).

The present study demonstrated the validation of qPCR assays for detection and quantitation of FIV and FeLV in domestic cats. First, *in silico* in-depth analyses of the available genomic sequences were carried out to ascertain the choice of primers and probes and to determine the amplification conditions for the developed PCRs. These analyses were fundamental for the analytical performance of the assays, allowing the identification of all FIV and FeLV lineages. After, both qPCR assays were implemented with synthetic DNA constructs. The experimental validation demonstrated a wide dynamic range of both assays. Finally, they were used for the detection and quantitation of these viruses in 100 blood samples from domestic cats.

Overall, both qPCRs presented a good correlation with IC rapid tests (0.94 for FIV and 0.73 for FeLV). Regarding FIV, only 15 resulted positive in the rapid test and qPCR. Most samples (n=79) were negative in both assays. Among the remaining 6 samples, three were positive in IC and negative in PCR, and other three negative in IC and positive in PCR. If IC is considered as the gold standard, the qPCR assay had a sensitivity of 83% and specificity of 96% with positive predictive values of

83% and negative predictive values of 96%. FIV-infected cats have low levels of proviral DNA and viral RNA during the long subclinical phase of infection, and some may even enter a stage of lentiviral latency (ie, undetectable plasma viral replication). Thus, although the PCR test can detect very low levels of DNA/RNA, it can still fail to detect infection by producing false-negative results in FIV-infected cats (Westman et al., 2022).

On oppose, FeLV was detected in 45 cats by both methods. And only 28 animals were negative by IC and qPCR. Among the remaining 27 samples, 20 (20%) were positive in IC rapid test results but negative PCR results, and 7 were negative in IC but positive in the qPCR. Thus, the qPCR had a sensitivity of 69% and specificity of 80%, with positive predictive values of 87% and negative predictive values of 58%. Similar findings were observed in previous studies (Beall et al., 2019; Beall et al., 2021). The divergent results in the case of FeLV can probably be explained by cats with regressive infections that are often recognized as having discordant test results (one positive and one negative). As regressive infections are related to lower amounts of p27 antigen and proviral DNA copy numbers compared to progressive infections, the discordant results between these two methods may be due to the biology of the disease and also the ability of these assays to produce a consistent result qualitative positive close to its limit of detection (Beall et al., 2021). The inclusion of RT-PCR for exFeLV showed that cats that were previously considered to have cleared FeLV infection contained proviral copies in their blood (Tandon et al., 2005; Beall et al., 2021).

The kappa statistic was calculated to assess the level of agreement between the rapid test for detection of FIV antibody p24 and the qPCR assay targeting gag gene as well for the FeLV p27 antigen and qPCR assay targeting U3 LTR. The FIV concordance analysis in the studies by Wang et al. (2010) was performed due to the need to verify the infection status of the animals, so all samples were submitted to the SNAP test for antibody detection. In PCR 61 (60%) of these samples were confirmed positive. The studies carried out by Tandon et al. (2005) performed an analysis of agreement based on the comparison of PCR assays with each other and with those of FeLV p27 ELISA. Where they obtained a much stronger correlation result of FeLV p27 ELISA with plasma viral RNA load ($r_s = 0.83$; $p < 0.0001$) than with proviral load ($r_s = 0.75$; $p < 0.0001$). A strong correlation was also found between viral and proviral loads in experimentally infected cats ($r_s = 0.84$; $p < 0.0001$). They also evaluated the effectiveness of the assays on experimentally infected cats, which were positive by the p27 ELISA and therefore assumed that the animals were indeed infected. All cats in that study were positive for the FeLV provirus; loads ranged from 65 copies to 4.7×10^9 copies per 10^6 white blood cells. Plasma viral RNA copy numbers in the same cats ranged from undetectable (3 out of 41 cats) to 2.4×10^{10} copies per ml of plasma.

Due to the change between the stages of FeLV infection, a single test should not be seen as satisfactory in suspected cases. This diagnosis can vary considerably depending on the course of the

infection and the feline's health status. Results will be negative while the virus is not circulating (regressive infection or “latency”) and possibly positive in scenarios of progressive infection and regressive reactivated infection (secondary to stress or immunosuppression) (Hartmann; Hofmann-Lehmann, 2020).

Our research, as well as previous studies, highlights the relevance of diagnostic PCR testing to define more accurate results of FIV infection and clarify the results of FeLV infection, allowing effective treatment of animals that initially tested negative for serological tests (Torres; Mathiason; Hoover, 2005; Cavalcante et al., 2018).

Furthermore, it is important to note the retroviruses frequencies data. The prevalence of animals infected with FIV is at least 19% and FeLV 45% (positive for both assays). Previous studies carried out in Brazil show a prevalence ranging from 3-47% for these viruses (Coelho et al., 2008; Lacerda et al., 2017; Poffo et al., 2017; Teixeira et al., 2019; Ortega et al., 2020). More studies are necessary to evaluate the real epidemiological scenario in the South Brazil (Martins et al., 2008; de Almeida et al., 2012; Teixeira et al., 2019; Biezu et al., 2019).

Conclusion

The present study demonstrated the effective validation of methods for the detection and quantification of FIV and FeLV. The results obtained demonstrate a positive correlation with qPCRs and IC rapid tests. In addition, the assays enabled the detection of low and high loads of viral concentrations.

Support / supplementary material

Supplementary File 1: Data collected from the 100 cats used to validate the methods.

Supplementary File 2: Dataset of 60 complete FIV genomes and 20 complete FeLV genomes.

Supplementary File 3: Viral load analysis of positive samples.

References

Bande F, Arshad SS, Hassan L, Zakaria Z, Sopian NA, Rahman NA, Alazawy A. Prevalence and risk factors of feline leukaemia virus and feline immunodeficiency virus in peninsular Malaysia. *BMC Vet Res.* 2012 Mar 22;8:33. doi: 10.1186/1746-6148-8-33.

Beall MJ, Buch J, Cahill RJ, Clark G, Hanscom J, Estrada M, Leutenegger CM, 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. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2019 Dec;67:101348. doi: 10.1016/j.cimid.2019.101348.

Beall MJ, Buch J, Clark G, Estrada M, Rakitin A, Hamman NT, Frenden MK, Jefferson EP, Amirian ES, Levy JK. Feline Leukemia Virus p27 Antigen Concentration and Proviral DNA Load Are Associated with Survival in Naturally Infected Cats. *Viruses*. 2021 Feb 15;13(2):302. doi: 10.3390/v13020302.

Biezus G, Machado G, Ferian PE, da Costa UM, Pereira LHHDS, Withoeft JA, 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.

Cano-Ortiz L, Tochetto C, Roehe PM, Franco AC, Junqueira DM. Could Phylogenetic Analysis Be Used for Feline Leukemia Virus (FeLV) Classification? *Viruses*. 2022 Jan 26;14(2):249. doi: 10.3390/v14020249.

Cavalcante LTF, Muniz CP, Jia H, Augusto AM, Troccoli F, Medeiros SO, Dias CGA, Switzer WM, Soares MA, Santos AF. Clinical and Molecular Features of Feline Foamy Virus and Feline Leukemia Virus Co-Infection in Naturally-Infected Cats. *Viruses*. 2018 Dec 11;10(12):702. doi: 10.3390/v10120702.

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.

de Almeida NR, Danelli MG, da Silva LH, Hagiwara MK, Mazur C. Prevalence of feline leukemia virus infection in domestic cats in Rio de Janeiro. *J Feline Med Surg*. 2012 Aug;14(8):583-6. doi: 10.1177/1098612X12444693.

Feuerman* M.; Miller AR. The kappa statistic as a function of sensitivity and specificity. *International Journal of Mathematical Education in Science and Technology*. 2005. v. 36, n. 5, p. 517-527.

Hartmann K. Clinical aspects of feline retroviruses: a review. *Viruses*. 2012 Oct 31;4(11):2684-710. doi: 10.3390/v4112684.

Hartmann K, Hofmann-Lehmann R. What's New in Feline Leukemia Virus Infection. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 2020 Sep;50(5):1013-1036. doi: 10.1016/j.cvsm.2020.05.006.

Helfer-Hungerbuehler AK, Widmer S, Kessler Y, Riond B, Boretti FS, Grest P, Lutz H, Hofmann-Lehmann R. Long-term follow up of feline leukemia virus infection and characterization of viral RNA loads using molecular methods in tissues of cats with different infection outcomes. *Virus Res*. 2015 Feb 2;197:137-50. doi: 10.1016/j.virusres.2014.12.025.

Katoh K, Standley DM. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol Biol Evol*. 2013 Apr;30(4):772-80. doi: 10.1093/molbev/mst010.

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.

Lacharoje S, Techangamsuwan S, Chaichanawongsaroj N. Rapid characterization of feline leukemia virus infective stages by a novel nested recombinase polymerase amplification (RPA) and reverse transcriptase-RPA. *Sci Rep*. 2021 Nov 11;11(1):22023. doi: 10.1038/s41598-021-01585-9.

Levy JK, Crawford PC, Tucker SJ. Performance of 4 Point-of-Care Screening Tests for Feline Leukemia Virus and Feline Immunodeficiency Virus. *J Vet Intern Med*. 2017 Mar;31(2):521-526. doi: 10.1111/jvim.14648.

Little S, Levy J, Hartmann K, Hofmann-Lehmann R, Hosie M, Olah G, Denis KS. 2020 AAFP Feline Retrovirus Testing and Management Guidelines. *J Feline Med Surg*. 2020 Jan;22(1):5-30. doi: 10.1177/1098612X19895940. PMID: 31916872.

Martins AN, Medeiros SO, Simonetti JP, Schatzmayr HG, Tanuri A, Brindeiro RM. Phylogenetic and genetic analysis of feline immunodeficiency virus gag, pol, and env genes from domestic cats undergoing nucleoside reverse transcriptase inhibitor treatment or treatment-naïve cats in Rio de Janeiro, Brazil. *J Virol*. 2008 Aug;82(16):7863-74. doi: 10.1128/JVI.00310-08.

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.

Poffo, D., Almeida, A. B., Nakazato, L., Dutra, V., Correa, S. H., Mendonça, A. J., , Sousa, V. R. (2017). Feline immunodeficiency virus (FIV), feline leukaemia virus (FeLV) and *Leishmania* sp. in domestic cats in the Midwest of Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 37, 491-494.

Rodan I, Sundahl E, Carney H, Gagnon AC, Heath S, Landsberg G, Seksel K, Yin S; American Animal Hospital Association. AAHP and ISFM feline-friendly handling guidelines. *J Feline Med Surg*. 2011 May;13(5):364-75. doi: 10.1016/j.jfms.2011.03.012.

Sykes JE, Hartmann K. Feline Leukemia Virus Infection. *Canine and Feline Infectious Diseases*. 2014:224–38. doi: 10.1016/B978-1-4377-0795-3.00022-3.

Tandon R, Cattori V, Gomes-Keller MA, Meli ML, Golder MC, Lutz H, Hofmann-Lehmann R. Quantitation of feline leukaemia virus viral and proviral loads by TaqMan real-time polymerase chain reaction. *J Virol Methods*. 2005 Dec;130(1-2):124-32. doi: 10.1016/j.jviromet.2005.06.017.

Teixeira BM, Taniwaki SA, Menezes PMM, Rodrigues AKPP, Mouta AN, Arcebispo TLM, Braz GF, da Cruz JCM, Brandão PE, Heinemann MB, Silva MX, Hosie MJ. Feline immunodeficiency virus in Northern Ceará, Brazil. *JFMS Open Rep*. 2019 Jul 8;5(2):2055116919859112. doi: 10.1177/2055116919859112.

Torres AN, Mathiason CK, Hoover EA. Re-examination of feline leukemia virus: host relationships using real-time PCR. *Virology*. 2005 Feb 5;332(1):272-83. doi: 10.1016/j.virol.2004.10.050.

Vobis M., D'Haese J., Mehlhorn H., Mencke N. Evidence of horizontal transmission of feline leukemia virus by the cat flea (*Ctenocephalides felis*) *Parasitol. Res*. 2003;91:467–470. doi: 10.1007/s00436-003-0949-8.

Wang C, Johnson CM, Ahluwalia SK, Chowdhury E, Li Y, Gao D, Poudel A, Rahman KS, Kaltenboeck B. Dual-emission fluorescence resonance energy transfer (FRET) real-time PCR differentiates feline immunodeficiency virus subtypes and discriminates infected from vaccinated cats. *J Clin Microbiol*. 2010 May;48(5):1667-72. doi: 10.1128/JCM.00227-10.

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.

Westman ME, Coggins SJ, van Dorsselaer M, Norris JM, Squires RA, Thompson M, Malik R. Feline immunodeficiency virus (FIV) infection in domestic pet cats in Australia and New Zealand: Guidelines for diagnosis, prevention and management. *Aust Vet J.* 2022 May 16. doi: 10.1111/avj.13166.

5. Discussão geral

Os retrovírus felinos FIV e FeLV são os agentes infecciosos que afetam gatos domésticos e silvestres no mundo todo (YAMAMOTO et al., 2010; HARTMANN, 2012; CHIU; HOOVER; VANDEWOUDE, 2018; BEALL et al., 2021). Assim como outros vírus de RNA, as sequências de nucleotídeos do RNA/DNA proviral e de aminoácidos das proteínas alteram constantemente (DOOLITTLE et al., 1989). A variabilidade genética dos retrovírus se dá em função de mutações pontuais devido à falta de atividade de leitura de prova da transcriptase reversa, e recombinação como consequência da mudança de modelo durante a transcrição reversa (CANO-ORTIZ et al., 2017). A segurança na detecção de vírus relevantes para o diagnóstico tem sido um receio que perdura há anos na área da virologia (MANI et al., 2021).

Ao longo dos anos, avanços notáveis nas tecnologias de sequenciamento e análise de genoma que possibilitaram a criação de enormes conjuntos de dados (LAPPALAINEN et al., 2019). O uso dessas tecnologias para o estudo da biologia molecular proporciona uma ampla investigação sobre os genomas dos organismos (CHEN et al., 2017). A área do sequenciamento de DNA evoluiu rapidamente possibilitando que a sua capacidade aumente drasticamente e os gastos reduzam do mesmo modo. À proporção que o sequenciamento em escala genômica se tornou mais acessível tem havido transformações no padrão da genômica para o uso do sequenciamento rápido e de alto rendimento para estudos em larga escala. Esses avanços recentes na biologia do genoma, sequenciamento de genes e bioinformática estão possibilitando abordagens cada vez mais sistemáticas para o projeto de ensaios e possuem impacto direto em diversas áreas da medicina, evolução, biodiversidade e biotecnologia (LEVY, BOONE, 2019; ZULCH et al., 2020).

Esses métodos genômicos têm a habilidade de realizar a identificação de forma mais abrangente. Apesar de ainda hoje existirem muitos desafios acerca dessas técnicas como a análise de bioinformática e a interpretação de grandes conjuntos de dados, elas têm se mostrado ferramentas cada vez mais relevantes e eficazes nos estudos para identificação rápida de surtos emergentes, triagens de vacinas e definição de diagnósticos precisos (CHIU, 2013).

O sequenciamento de genes desempenha um papel fundamental na verificação de resultados de PCR e é usado para fornecer dados de sequência genética extremamente relevantes para estudos de análise filogenética (CROSSLEY et al., 2020). Através do aperfeiçoamento dessas técnicas de sequenciamento e ferramentas de alto rendimento, o número de sequências genômicas depositadas em bancos de dados como o GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) cresceu abundantemente. Dessa forma, houve um aumento exponencial de variantes e espécies, assim como sequências de patógenos recém-identificados de todo o mundo (VAN WEEZEP; KOOI; RIJN, 2019).

A análise de genomas facilita o desenvolvimento de diagnósticos baseados em PCR visando os elementos genômicos mais diversos e específicos. Apesar de, em alguns casos, os instrumentos disponíveis no momento possam fornecer desempenho igual ou superior, a análise sistemática de alvos em potencial propicia confiança de que os ensaios definidos representam as opções mais vantajosas disponíveis (ZULCH et al., 2020).

A classificação filogenética de FIV realizado nesse estudo a partir das análises *in silico* das sequências públicas do genoma completo e do gene *env* completo, depositadas no GenBank apresentou 12 eventos de recombinação com 19 sequências envolvidas nos dados WGS e um total de 27 eventos de recombinação onde 49 sequências estavam envolvidas na análise do gene *env*. Nas análises de WGS foi possível relatar a presença de recombinação intrasubtipos, que consistem em recombinações entre um mesmo subtipo (A/A; B/B), e recombinação intersubtipos, que compreendem em recombinações que ocorrendo entre dois ou mais subtipos diferentes (A/B; A/C; B/D). Eventos de recombinação aumentam a taxa de evolução dos retrovírus e cria variantes de forma muito mais rápida e eficiente do que as mutações o que ocasiona a expansão exponencial da diversidade genética. Episódios dessa proporção contribuem para o aumento da eficiência do vírus (REGGETI, BIENZLE, 2004). Após a exclusão dos recombinantes as análises filogenéticas foram estabelecidas e foi possível observar a diferença genética evolutiva entre os gatos selvagens e domésticos pela formação de diferentes clados, e a formação de clusters para quase todos os subtipos de FIV já descritos (A, B, C, E, U, W). A avaliação filogenética de WGS e de genes (no caso de FIV e FeLV, os genes *env*, *pol* e *gag*) são muito importantes para verificar as linhagens circulantes de um local. Inicialmente o objetivo acerca do estudo era avaliar com base nas análises de filogenia das sequências disponíveis, a atual filogenia molecular global e a disseminação temporal de FIV. Mas com as poucas sequências de genoma completo e informações disponíveis não foi possível obter sinal temporal. Portanto, não foi viável a realização de avaliações evolutivas.

O mesmo estudo não foi realizado com FeLV, pois se trata de um retrovírus mais complexo, que apresenta muitas variações e muitas recombinações com cepas endógenas, e com as ferramentas que possuímos não foi viável classificar e realizar estudos filogenéticos e evolutivos.

O diagnóstico para detecção desses retrovírus ainda é geralmente realizado através da detecção de antígenos e anticorpos de FIV e FeLV em sangue total, soro ou plasma. Com o passar dos anos, os testes rápidos ou *point-of-care* (POC) baseados na imunomigração rápida (RIM) têm sido cada vez mais utilizados na rotina clínica devido à sua praticidade (LITTLE et al., 2020). A necessidade de reteste e comparação de técnicas em caso de testes de triagem positivos ou com resultados questionáveis é altamente recomendada para confirmação do resultado (LEVY et al., 2017; LITTLE et al., 2020; WESTMAN et al., 2022). Devido a isso, a detecção de DNA proviral ou RNA viral por meio de PCR tornou-se habitual e utilizada como teste adicional e confirmatório na rotina

laboratorial, principalmente porque os testes sorológicos não são mais tão precisos após a vacinação (WESTMAN et al., 2019). A respeito do FIV, é importante salientar que não existe vacina comercial no Brasil, logo, esse não é um problema que será encontrado no país.

O diagnóstico por meio de PCR em tempo real tem sido amplamente utilizado para a detecção de patógenos em todo o mundo. Esta técnica pode ser altamente sensível e específica e é habitualmente desenvolvida para identificar as variantes de uma família, gênero ou espécie, sem a detecção de patógenos estreitamente relacionados e é considerada superior a outros métodos imunológicos. Além disso, possibilita a quantificação viral que é importante na análise de casos clínicos para maior esclarecimento da patogênese e desfecho das infecções (TANDON et al., 2008; HARTMANN, 2012; VAN WEEZEP; KOOI; RIJN, 2019; LACHAROJE; TECHANGAMSUWAN; CHAICANAWONGSAROJ, 2021).

Estudos de diversidade genética das cepas circulantes são cruciais para o desenvolvimento de estratégias de imunização e para a produção e validação de testes diagnósticos, principalmente aqueles que se baseiam na detecção de material genético do vírus (MARTINS et al., 2018). Em vista disso, os alvos usados devem ser altamente conservados. Entretanto, devido à deriva genética, adaptação, evolução, e variantes de patógenos relacionados à infecção alvo, os patógenos podem apresentar imensa variabilidade genética podendo ocasionar resultados falsos negativos e positivos (VAN WEEZEP; KOOI; RIJN, 2019). Para a projeção eficaz de métodos de detecção de patógenos como os ensaios de PCR, é de grande relevância verificar de forma adequada, entre outros fatores, a especificidade do método. Essa avaliação deve ser realizada ao desenvolver o teste e para que exista garantia da eficácia do método, deve ser realizada vigilância constante, principalmente para patógenos de alta evolução. Análises dessa natureza podem ser demoradas e até inviáveis em laboratório devido à escassez de um acervo de cepas representativas. Contudo, essa avaliação pode ser realizada inicialmente através de uma análise *in silico* com o uso de dados de sequenciamento de genoma inteiro disponíveis publicamente e ferramentas de bioinformática apropriadas (GAND et al., 2020).

O estudo *in silico*, utilizado nessa pesquisa, consistiu basicamente, na análise de sequências correspondentes ou não, da sequência alvo a ser detectada pelo ensaio de PCR em um banco de dados de nucleotídeos. As sequências correspondentes possibilitam a verificação da sensibilidade do método (na detecção de todas as variantes), à medida que as sequências não correspondentes propiciam a especificidade *in silico* da técnica (realizando a detecção seletiva de variantes do respectivo grupo de patógenos). Essa abordagem tem se tornado uma função crescente devido ao rápido aumento de sequências genômicas disponibilizadas. Portanto, é relevante ressaltar a importância da análise *in silico* de ensaios já validados, a necessidade de vigilância genômica constante e se necessário, a reprojeção dos testes tendo em vista as sequências de variantes de novos

patógenos e/ou mutações, para a obtenção de diagnósticos eficazes, além de informações acuradas na detecção de variantes circulantes e (re) emergentes (VAN WEEZEP; KOOI; RIJN, 2019). O estudo realizado através das sequências por meio de ferramentas de bioinformáticas tem atestado cada vez mais a sua importância para que as etapas posteriores da validação do ensaio sejam bem sucedidas. A aplicação dessas ferramentas para FIV e FeLV são muito importantes dada a rapidez da evolução e recombinação viral desses patógenos que acabam resultando em novas variantes.

Em resumo, é essencial a projeção de um conjunto de detecção que envolva todas as variantes em circulação. No caso desses retrovírus, novas informações sobre possíveis novos subtipos e subgrupos dentro desses subtipos tem sido relatado constantemente. O presente estudo demonstrou a efetiva validação de métodos para detecção e quantificação de FIV e FeLV. Os resultados obtidos demonstram uma correlação muito boa com os testes imunocromatográficos. Além disso, os ensaios possibilitaram a detecção de cargas baixas e altas de concentrações virais apresentando Cts variando entre 25,3-37,4 para FIV e entre 13,4-37,8 para FeLV. Ambos estudos reforçam a importância do sequenciamento do genoma, estudos de sequência e filogenia *in silico* e das práticas *in silico* como ferramentas fundamentais no desenho e padronização de ensaios de PCR, bem como para esclarecer a genética, e as variantes circulantes.

Em vista de que essas retrovíroses não possuem tratamento efetivo até o momento, fazendo com que sua terapia seja geralmente sintomática, torna-se relevante estudos dessa temática em virtude da ausência de cura, bem como para o melhor conhecimento do prognóstico e manejo de animais infectados, dado que as infecções apresentam carácter vitalício.

6. Conclusão e Perspectivas

Nessa pesquisa foi possível verificar a fundo a importância da análise de sequências de genomas e o estudo da evolução e disseminação molecular de patógenos por meio de abordagens filogenéticas. Esses dados complementarizam os estudos e a compreensão dos padrões evolutivos, fornecendo uma base útil para entender os mecanismos moleculares da transmissão, análise do surgimento de novas variantes, eficácia e produção de vacinas e ainda as abordagens mais efetivas em questão de diagnóstico e tratamento. Essa pesquisa também reforça a importância de estudos dessa temática, do sequenciamento do genoma e das práticas *in silico* como ferramentas fundamentais no desenho e padronização de ensaios de PCR.

Entre as perspectivas desse projeto se encontram a realização do sequenciamento das amostras positivas de FIV visando mais estudos de abordagem filogenética e temporal, já que não foi possível anteriormente devido à escassez de sequências disponíveis, para maior esclarecimento da evolução molecular, subtipagem e auxiliar a melhor compreender a patogênese da doença. Efetuar também o sequenciamento de amostras positivas de FeLV buscando a possibilidade de realizar mais estudos acerca das recombinações complexas do vírus. Realizar estudos usando essas metodologias para análise filogenética e evolutiva *in silico* para outros patógenos de interesse. Realizar um estudo epidemiológico para verificar a ampla distribuição das retrovírus. E ainda, um acompanhamento das infecções regressivas e progressivas de FeLV e analisar a fundo os resultados de infecção e prognóstico com o auxílio da quantificação viral.

7. Referências

- ALLISON, R. W.; HOOVER, E. A. (2003) Covert vertical transmission of feline immunodeficiency virus. *AIDS Research and Human Retroviruses*, v. 19, p. 421-434.
- ALMEIDA, N. R.; DANELLI, M. G. M.; SILVA, L. H. P.; HAGIWARA, M.K.; MAZUR, C. (2012) Prevalence of feline leukemia virus infection in domestic cats in Rio de Janeiro. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, v. 14, p. 583-586, 2012.
- ALVES, M. C. R.; CONTI, L. M. C.; DONATELE, D.M.; CASTRO, L. M et al. (2015) Leucemia viral felina: revisão. *Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia*, Maringá, v. 9, n. 2, p. 86-100.
- AMMERSBACH, M., LITTLE, S., BIENZLE, D. (2013). Preliminary evaluation of a quantitative polymerase chain reaction assay for diagnosis of feline immunodeficiency virus infection. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 15(8), 725–9.
- ANAI, Y.; OCHI, H.; WATANABE, S.; NAKAGAWA, S.; KAWAMURA, M. et al. (2012) Infectious endogenous retroviruses in cats and emergence of recombinant viruses. *Journal of Virology*: 86 (16). p. 8634–8644.
- ARJONA, A.; ESCOLAR, E.; SOTO, I.; BARQUERO, N.; MARTIN, D.; GOMEZ-LUCIA, E. (2000). Seroepidemiological survey of infection by feline leukemia virus and immunodeficiency virus in Madrid and correlation with some clinical aspects. *Journal of Clinical Microbiology*, p. 3448-3449.
- ARJONA, A.; BARQUERO, N.; DOME'NECH, A.; TEJERIZO, G.; COLLADO, V. M.; TOURAL, C.; MARTIN, D.; GOMEZ-LUCIA, E. (2007) 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*, v. 9, p. 14-22.
- BACHMANN, M.H., MATHIASON-DUBARD, C., LEARN, G.H., RODRIGO, A.G., SODORA, D.L., MAZZETTI, P., HOOVER, E.A., MULLINS, J.I. (1997). Genetic diversity of feline immunodeficiency virus: dual infection, recombination, and distinct evolutionary rates among envelope sequence clades. *Journal of Virology* 71, 4241–4253.
- BANDE, F.; ARSHAD, S. S.; HASSAN, L.; ZAKARIA, Z.; SAPIAN, N. A.; RAHMAN, N. A.; ALAZAWY, A. (2012) Prevalence and risk factors of feline leukaemia virus and feline immunodeficiency virus in peninsular Malaysia. *BMC Veterinary Research*, v. 8, p. 1-6.
- BANDECCHI, P., MATTEUCCI, D., BALDINOTTI, F., GUIDI, G., ABRAMO, F., TOZZINI, F., BENDINELLI, M. (1992). Prevalence of feline immunodeficiency virus and other retroviral infections in sick cats in Italy. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 31, 337 – 345.
- BARR, M.C.; CALLE, P.P.; ROELKE, M.E. (1989). Feline immunodeficiency virus infections in nondomestic felids. *Journal Zoo Wildlife Medicine*, v. 20, n.1, p. 265-272.
- BEALL, M.J.; BUCH, J.; CLARK, G.; ESTRADA, M.; RAKITIN, A.; HAMMAN, N.T.; FRENDEEN, M.K.; JEFFERSON, E.P.; AMIRIAN, E.S.; LEVY, J.K. (2021). Feline Leukemia Virus p27 Antigen Concentration and Proviral DNA Load Are Associated with Survival in Naturally Infected Cats. *Viruses*. Feb 15;13(2):302. doi: 10.3390/v13020302.

- BELLWOOD, P. (2005). *First farmers: the origins of agricultural societies*, Oxford, Blackwell Publishing.
- BENVENISTE, R. E., SHERR, C. J., TODARO, G. J. (1975). Evolution of type C viral genes: Origin of feline leukemia virus. *Science*, v. 190, p. 886–888.
- BIENZLE, D., REGGETI, F., WEN, X., LITTLE, S., HOBSON, J., KRUTH, S. (2004). The variability of serological and molecular diagnosis of feline immunodeficiency virus infection. *The Canadian Veterinary Journal*, 45(9), 753–7.
- BIEZUS, G. (2017) Infecção pelo vírus da Leucemia (FeLV) e Imunodeficiência (FIV) em gatos do planalto de Santa Catarina: prevalência, fatores associados, alterações clínicas e hematológicas / *Dissertação de Mestrado - UDESC*. Lages (SC).
- BISOL, J. (2016). Avaliação da concordância dos resultados da técnica de PCR e da técnica de imunodifusão rápida para o diagnóstico do vírus da imunodeficiência felina (FIV) e da leucemia felina (FeLV) em amostras de sangue de gatos atendidos no Setor de Medicina Felina do HCV/ UFRGS. *Trabalho de Conclusão de Curso em Medicina Veterinária - UFRGS*, Porto Alegre (RS).
- BOENZLI, E., HADORN, M., HARTNACK, S., HUDER, J., HOFMANN-LEHMANN, R., , LUTZ, H. (2014). Detection of Antibodies to the Feline Leukemia Virus (FeLV) Transmembrane Protein p15E: an Alternative Approach for Serological FeLV Diagnosis Based on Antibodies to p15E. *Journal of Clinical Microbiology*, 10-19.
- BOLIN, L. L.; LEVY, L. S. (2011) Viral Determinants of FeLV Infection and Pathogenesis: Lessons Learned from Analysis of a Natural Cohort. *Viruses*, v. 3, p. 1681-1698.
- BONHOMME, F.; MARTIN, S.; THALER, L. (1978). Hybridation en laboratoire de *Mus musculus* L. et *Mus spretus* lataste, *Experientia* 34:1140.
- BRADSHAW, J.W. (2006). The evolutionary basis for the feeding behavior of domestic dogs (*Canis familiaris*) and cats (*Felis catus*). *The Journal of Nutrition*. Jul;136(7 Suppl):1927S-1931S. doi: 10.1093/jn/136.7.1927S.
- BROOM, D M.; FRASER, A F. (2010). *Comportamento e bem-estar de animais domésticos – 4a ed.* Barueri, SP. Editora Manole, 2010. 9788520455715. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788520455715/>. Acesso em: 22 jul. 2022.
- BROWN, E.W.; YUHKI, N.; PACKER, C.; O'BRIEN, S.J. (1994) A lion lentivirus related to feline immunodeficiency virus: epidemiologic and phylogenetic aspects. *Journal of Virology*.; 68:5953–5968.
- BUI, T.H; IKEUCHI, S.; O'BRIEN, Y.S.; NIWA, T.; HARA-KUDO, Y.; TANIGUCHI, T.; HAYASHIDANI, H. Multiplex PCR method for differentiating highly pathogenic *Yersinia enterocolitica* and low pathogenic *Yersinia enterocolitica*, and *Yersinia pseudotuberculosis*. *Journal of Veterinary Medical Science*. 83(12):1982-1987. doi: 10.1292/jvms.21-0358.
- BURLING, A.N.; LEVY, J.K.; SCOTT, H.M.; CRANDALL, M.M.; TUCKER, S.J.; WOOD, E.G.; FOSTER, J.D. (2017) Seroprevalences of feline leukemia virus and feline immunodeficiency virus infection in cats in the United States and Canada and risk factors for seropositivity. *Journal American Veterinary Medicine Association* 15;251(2):187-194.
- CANO-ORTIZ, L.; JUNQUEIRA, D.M.; COMERLATO, J.; COSTA, C.S.; ZANI, A.; DUDA, N.B.;

TOCHETTO, C.; DOS SANTOS, R.N.; DA COSTA, F.V.A.; ROEHE, P.M.; FRANCO, A.C. (2017) Phylodynamics of the Brazilian feline immunodeficiency virus. *Infection, Genetics and Evolution* 11;55:166-171. doi: 10.1016/j.meegid.2017.09.011.

CARPENTER, M.A.; BROWN, E.W.; CULVER, M.; JOHNSON, W.E.; PECON-SLATTERY, J.; BROUSSET, D.; O'BRIEN, S.J. (1996) Genetic and Phylogenetic Divergence of Feline Immunodeficiency Virus in the Puma (*Puma concolor*). *Journal of Virology*; 70:6682–6693.

CARPENTER, M.A.; BROWN, E.W.; MACDONALD, D.W.; O'BRIEN SJ. (1998) Phylogeographic patterns of feline immunodeficiency virus genetic diversity in the domestic cat. *Virology*; 251:234–243.

CATTORI, V.; TANDON, R.; PEPIN, A.; LUTZ, H. HOFMANN-LEHMANN, R. (2006) Rapid detection of feline leukemia virus provirus integration into feline genomic DNA. *Molecular and Cellular Probes*: 20. 2006. p. 172–181.

CAXITO, F.A.; COELHO, M.E.; RESENDE, M. (2006) Phylogenetic analysis of feline immunodeficiency virus strains from State of Minas Gerais, Brazil. *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 58, n. 6, p. 1222-1225.

CHAMBERLAIN JS, GIBBS RA, RANIER JE, NGUYEN PN, CASKEY CT. (1988). Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Research*. 16(23):11141-56. doi: 10.1093/nar/16.23.11141.

CHANG FUNG MARTEL J., GUMMOW B., BURGUESS G., FENTON E., SQUIRES R. (2013) A door-to-door prevalence study of feline immunodeficiency virus in an Australian suburb. *Journal of Feline Medicine and Surgery*. 2013.0(0):1- 9 p.

CHEN C, HUANG H, WU CH. (2017). Protein Bioinformatics Databases and Resources. *Methods in Molecular Biology*. 1558:3-39. doi: 10.1007/978-1-4939-6783-4_1.

CHIU, C.Y. (2013). Viral pathogen discovery. *Current Opinion in Microbiology*. Aug;16(4):468-78. doi: 10.1016/j.mib.2013.05.001.

CHIU, E.S.; HOOVER, E.A.; VANDEWOUDE, S. A. (2018). Retrospective Examination of Feline Leukemia Subgroup Characterization: Viral Interference Assays to Deep Sequencing. *Viruses*. 2018;10(1):29. doi:10.3390/v10010029.

CHIU, E. S.; KRABERGER, S.; CUNNINGHAM, M.; CUSACK, L.; ROELKE, M.; VANDEWOUDE, S. (2019). Multiple Introductions of Domestic Cat Feline Leukemia Virus in Endangered Florida Panthers. *Emerging infectious diseases*, 25(1), 92–101. <https://doi.org/10.3201/eid2501.181347>

COELHO, F.M.; BOMFIM, M.R.; DE ANDRADE CAXITO, F.; RIBEIRO, N.A.; LUPPI, M.M.; COSTA, E.A.; OLIVEIRA, M.E.; DA FONSECA, F.G.; RESENDE, M. (2008). Naturally occurring feline leukemia virus subgroup A and B infections in urban domestic cats. *Journal of Genetic Virology*. 89 Pt 11:2799–2805. doi: 10.1099/vir.0.2008/003855-0.

COFFIN, J.; BLOMBERG, J.; FAN, H.; GIFFORD, R.; HATZIIOANNOU, T.; LINDEMANN, D.; MAYER, J.; STOYE, J.; TRISTEM, M.; JOHNSON, W.; ICTV REPORT CONSORTIUM. (2021) ICTV Virus Taxonomy Profile: Retroviridae 2021. *Journal of the General Virology*. 102(12):001712. doi: 10.1099/jgv.0.001712

COURCHAMP, F.; PONTIER, P. (1994) Feline immunodeficiency virus: an epidemiology review. *Comptes rendus de L'academie des Sciences Paris*, v. 317, n. 1, p. 1123- 1134.

COURCHAMP, F., YOCCOZ, N. G., ARTOIS, M. , PONTIER D. (1998). At risk individual in feline immunodeficiency virus epidemiologic: evidence from a multivariate approach in a natural population of domestic cats (*Felis catus*). *Epidemiology and Infection.*, 121, 227 – 236.

COSTA, F. V. A. da.; VALLE, S.F.; MACHADO, G.; CORBELLINI, L.G.; COELHO, E.M.; ROSA, R.B.; GONZÁLEZ, F.H.D. (2017). Hematological findings and factors associated with feline leukemia virus (FeLV) and feline immunodeficiency virus (FIV) positivity in cats from southern Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, [s.l.], v.37, n.12, p.1531-1536. DOI: 10.1590/s0100-736x2017001200028.

CRAWFORD, P.C., SLATER, M.R., , LEVY, J. K. (2005). Accuracy of polymerase chain reaction assays for diagnosis of feline immunodeficiency virus infection in cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 226(9), 1503–7.

CRAWFORD, P.C., , LEVY, J.K. (2007). New challenges for the diagnosis of feline immunodeficiency virus infection. *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice*, 37(2), 335–50.

CROSSLEY, B.M.; BAI, J.; GLASER, A.; MAES, R.; PORTER, E.; KILLIAN, M.L.; CLEMENT, T.; TOOHEY-KURTH, K. (2020). Guidelines for Sanger sequencing and molecular assay monitoring. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. Nov;32(6):767-775. doi: 10.1177/1040638720905833.

CUNNINGHAM, M.W.; BROWN, M.A.; SHINDLE, D.B.; TERRELL, S.P.; HAYES, K.A.; FERREE, B.C.; MCBRIDE, R.T.; BLANKENSHIP, E.L.; JANSEN, D.; CITINO, S.B.; ROELKE, M.E.; KILTIE, R.A.; TROYER, J.L.; O'BRIEN, S.J. (2008). Epizootiology and Management of Feline Leukemia Virus in the Florida Puma. *Journal of Wildlife Diseases*, 44(3), p. 537–552.

DOOLITTLE, R.F.; FENG, D.F.; JOHNSON, M.S.; MCCLURE, M.A. (1989). Origins and evolutionary relationships of retroviruses. *The Quarterly Review of Biology*. Mar;64(1):1-30. doi: 10.1086/416128.

DUARTE, A.; MARQUES, M.I.; TAVARES, L.; FEVEREIRO, M. (2002). Phylogenetic analysis of five Portuguese strains of FIV. *Archives of Virology*. 147(5):1061-70. doi: 10.1007/s00705-002-0785-7.

DUARTE, A.; TAVARES, L. (2006). Phylogenetic analysis of Portuguese feline immunodeficiency virus sequences reveals high genetic diversity. *Veterinary Microbiology*, 114, 25–33. doi: 10.1016/j.vetmic.2005.11.056

DUARTE, A. et al. (2012). Vírus da imunodeficiência felina (FIV): da etiologia às novas abordagens terapêuticas. *Medicina Veterinária*, v. 66, 2012. p. 37-43.

DUNHAM, S. P.; GRAHAM, E. (2008). Retroviral Infections of Small Animals. *Veterinary Clinic Small Animal Practice*. 38(4), 0–901. doi:10.1016/j.cvsm.2008.03.005

ERBECK, K.; GAGNE, R.B.; KRABERGER, S.; CHIU, E.S.; ROELKE-PARKER, M.; VANDEWOUDE, S. (2021). Feline Leukemia Virus (FeLV) Endogenous and Exogenous

Recombination Events Result in Multiple FeLV-B Subtypes during Natural Infection. *Journal of Virology*. 25;95(18):e0035321. doi: 10.1128/JVI.00353-21.

ELDER, J.H; MULLINS, J.I. (1983). Nucleotide sequence of the envelope gene of Gardner-Arnstein feline leukemia virus B reveals unique sequence homologies with a murine mink cell focus-forming virus. *Journal of Virology*. 46:871–880. doi:10.1128/JVI.46.3.871-880.1983.

ENGLISH R.V. Feline immunodeficiency virus. In: Bonagura J.D., editor. *Kirk's Current Veterinary Therapy*. WB Saunders; Philadelphia: 1995.

ENGLERT, T; LUTZ, H; SAUTER-LOUIS, C; HARTMANN, K. (2012) Survey of the feline leukemia virus infection status of cats in Southern Germany. *Journal of Feline Medicine and Surgery*. 14(6):392-8. doi: 10.1177/1098612X12440531.

FERNANDES, A.P.R.P. (2015). Prevalência do Vírus da Imunodeficiência Felina (FIV) e do Vírus da Leucemia Felina (FeLV) e Fatores de Risco associados à seropositividade em gatos domésticos do Distrito de Lisboa. *Dissertação de Mestrado - Universidade de Trás-os-montes e Alto Douro*, Lisboa.

FIGUEIREDO, A. S; ARAUJO JUNIOR, J. P. (2011). Vírus da leucemia felina: análise da classificação da infecção, das técnicas de diagnóstico e da eficácia da vacinação com o emprego de técnicas sensíveis de detecção viral. *Ciência Rural*, Santa Maria, RS, v. 41, n. 11, p. 1952-1959.

FILONI C., CATÃO-DIAS J.L., LUTZ H., HOFMANN-LEHMANN R. (2008). Retrovirus infections and Brazilian wild felids. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology*. 1(2): 88- 96 p.

FILONI, C; HELFER-HUNGERBUEHLER, A.K.; CATÃO-DIAS, J.L.; MARQUES, M.C.; TORRES, L.N.; REINACHER, M.; HOFMANN-LEHMANN, R. (2017). Putative progressive and abortive feline leukemia virus infection outcomes in captive jaguarundis (*Puma yagouaroundi*). *Journal of Virology*. 14(1):226. doi:10.1186/s12985-017-0889-z

FLETCHER, R.H., FLETCHER, S.W.; FLETCHER, G.S. *Epidemiologia Clínica: Elementos essenciais* 5. Ed. Porto alegre: *Artmed*, 2014.

FRANKLIN SP, TROYER JL, TERWEE JA, LYREN LM, BOYCE WM, RILEY SPD, ROELKE ME, CROOKS KR, VANDEWOUDE S. (2007). Frequent transmission of immunodeficiency viruses among bobcats and pumas. *Journal of Virology*. 81:10961–10969.

FREED EO. (2002). Viral late domains. *Journal of Virology*. 76(10):4679-87. doi: 10.1128/jvi.76.10.4679-4687.2002.

FROMONT, E; PONTIER, D; LANGLAIS, M. (2003). Disease propagation in connected host populations with density-dependent dynamics: the case of the Feline Leukemia Virus. *Journal of Theoretical Biology*, v. 223, n. 4, p.465-475.

FLYNN, J., DUNHAM, S., WATSON, V., , JARRETT, O. (2002). Longitudinal analysis of feline leukemia virus specific cytotoxic T lymphocytes: correlation with recovery from infection. *Journal of Virology*, 76, 2306-2315.

GAND, M.; VANNESTE, K.; THOMAS, I.; VAN GUCHT, S.; CAPRON, A.; HERMAN, P.; ROOSENS, N.H.C.; DE KEERSMAECKER, S.C.J. (2020). Use of Whole Genome Sequencing Data

for a First in Silico Specificity Evaluation of the RT-qPCR Assays Used for SARS-CoV-2 Detection. *International Journal of Molecular Sciences*. Aug 4;21(15):5585. doi: 10.3390/ijms21155585.

GARDNER, M.B., (1991). Simian and feline immunodeficiency viruses: animal lentivirus models for evaluation of AIDS vaccines and antiviral agents. *Antiviral Research*. 15, 267–286.

GATES, M.C.; VIGEANT, S.; DALE, A. (2017). Prevalence and risk factors for cats testing positive for feline immunodeficiency virus and feline leukemia virus infection in cats entering an animal shelter in New Zealand. *New Zealand Veterinary Journal*. 65:285–291. doi: 10.1080/00480169.2017.1348266.

GERET, C.P.; CATTORI, V.; MELI, M.L.; RIOND, B.; MARTÍNEZ, F.; LÓPEZ, G.; VARGAS, A.; SIMÓN, M.A.; LÓPEZ-BAO, J.V.; HOFMANN-LEHMANN, R.; LUTZ H. (2011). Feline leukemia virus outbreak in the critically endangered Iberian lynx (*Lynx pardinus*): high-throughput sequencing of envelope variable region A and experimental transmission. *Archives of Virology*. 156, 839–854. <https://doi.org/10.1007/s00705-011-0925-z>

GIL, S. , LEAL, R. (2012). FIV: O vírus da imunodeficiência felina. *Jornal Saúde Notícias*. Out. 2012, p.14.

GLEICH, S. E.; KRIEGER, S.; HARTMANN, K. (2009). Prevalence of feline immunodeficiency virus and feline leukemia virus among client-owned cats and risk factors for infection in Germany. *Journal Feline Medicine and Surgery*. v.11, p.985–992.

GOMES-KELLER, M. A., TANDON, R., GÖNCZI, E., MELI, M. L., HOFMANN-LEHMANN, R., , LUTZ, H. (2006). Shedding of feline leukemia virus RNA in saliva is a consistent feature in viremic cats. *Veterinary Microbiology*. 112(1), 11-21.

GOTO Y., NISHIMURA Y., MIZUNO T., ENDO Y., BABA K., MOMOI Y., WATARI T., HASEGAWA A., TSUJIMOTO H. (2000). Quantification of viral ribonucleic acid in plasma of cats naturally infected with feline immunodeficiency virus. *American Journal of Veterinary Research*. 61:1609–1613

GRACE, S.F. (2004). Infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Felina. In: NORSWORTHY, G. D. et al. O Paciente Felino: tópicos essenciais de diagnóstico e tratamento. São Paulo. *Editora Manole*. p. 244-247.

GRACE, S.F. (2011). Feline immunodeficiency virus infection. In G. D. Norsworthy, M. A. Crystal, S. F. Grace, L. P. Tilley (Eds.), *The Feline Patient* (4th ed.). (pp. 179 – 180). Iowa, USA: Blackwell Science Ltd.

GREENE, C.E. (2005). *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. 3^a ed. Philadelphia, 2005. 1376p

HARDY, W.D. Jr.; HESS, P.W.; MACEWEN, G.E.; MCCLELLAND, A.J.; ZUCKERMAN, E.E.; ESSEX, M.; COTTER, M.S.; JARRETT, O. (1976). Biology of feline leukemia virus in the natural environment. *Cancer Research*, v.36, p.582-588.

HARTMANN, K. (2004). Feline Leukemia Virus Infection. *Veterinary Interferon Handbook*, 1^a ed., Virbac S.A. 2004. 35- 68 p.

HARTMANN, K. (2006). Feline leukemia virus infection. In: GREENE, C.E. *Infectious disease of the dog and cat*. 3.ed. Georgia: *Elsevier*, 2006. Cap.13, p.105-131.

- HARTMANN, K., P. GRIESSMAYR, B. SCHULZ, C. E. GREENE, A. N. VIDYASHANKAR, O. JARRETT, AND H. F. EGBERINK. (2007). Quality of different in-clinic test systems for feline immunodeficiency virus and feline leukemia virus infection. *Journal of Feline Medicine and Surgery*. 9:439-445.
- HARTMANN, K. (2012a). Clinical aspects of feline retroviruses: a review. *Viruses*: 4. 2012a. p. 2684- 2710.
- HARTMANN, K. (2012b). Feline Leukemia Virus Infection. In: GREENE, C. E. (Org.). Infectious Diseases of the Dog and the Cat. 4th. ed. [S.l.]: *Elsevier Health Science*, 2012b. p. 108–149.
- HARTMANN, K.; WOODING, A.; BERGMANN, M. (2015). Efficacy of Antiviral Drugs against Feline Immunodeficiency Virus. *Veterinary Science*. 2(4):456-476. doi:10.3390/vetsci2040456
- HARTMANN, K.; HOFMANN-LEHMANN, R. (2020). What's New in Feline Leukemia Virus Infection. *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice*. 50(5):1013-1036. doi: 10.1016/j.cvsm.2020.05.006.
- HAYWARD, W. S., NEEL, B. G., ASTRIN, S. M. (1981). Activation of a cellular onc gene by promoter insertion in ALV-induced lymphoid leukosis. *Nature*. 290(5806):475-80. doi: 10.1038/290475a0.
- HAYWARD, J.J.; TAYLOR, J.; RODRIGO, A.G. (2007). Phylogenetic analysis of feline immunodeficiency virus in feral and companion domestic cats of New Zealand. *Virology Journal*. 81:2999–3004
- HAYWARD, J.J.; RODRIGO, A.G. (2008). Recombination in feline immunodeficiency virus from feral and companion domestic cats. *Journal of Virology*. 5:76
- HAYWARD, J.; RODRIGO, A.G. (2010). Molecular epidemiology of feline immunodeficiency virus in the domestic cat (*Felis catus*). *Veterinary Immunology and Immunopathology*. v.134, p.68-74.
- HELPER-HUNGERBUEHLER, A.K.; CATTORI, V.; BORETTI, F.S.; OSSENT, P.; GREY, P.; REINACHER, M.; HENRICH, M.; BAUER, E.; BAUER-PHAM, K.; NIEDERER, E.; HOLZNAGEL, E.; LUTZ, H.; HOFMANN-LEHMANN, R. (2010). Dominance of highly divergent feline leukemia virus A progeny variants in a cat with recurrent viremia and fatal lymphoma. *Retrovirology*. 19;7:14. doi: 10.1186/1742-4690-7-14.
- HELPER-HUNGERBUEHLER, A. K.; WIDMER, S.; KESSLER, Y.; RIOND, B.; BORETTI, F.S.; GREY, P.; LUTZ, H.; HOFMANN-LEHMANN, R. (2015). Long-term follow up of feline leukemia virus infection and characterization of viral RNA loads using molecular methods in tissues of cats with different infection outcomes. *Virus Research*. 2;197:137-50. doi: 10.1016/j.virusres.2014.12.025.
- HOFMANN-LEHMANN, R.; HUDER, J.; GRUBER, S. (2001). Feline leukemia provirus load during the course of experimental infection and in naturally infected cats. *Journal of Genetic Virology*. 82, 1589-1596.
- HOFMANN-LEHMANN, R.; CATTORI, V.; TANDON, R.; BORETTI, F.S.; MELI, M.L.; RIOND, B.; PEPIN, A.C.; WILLI, B.; OSSENT, P.; LUTZ, H. (2007). Vaccination against the feline leukemia

virus: outcome and response categories and long-term follow-up. *Vaccine*. 25(30):5531-9. doi: 10.1016/j.vaccine.2006.12.022.

HOFMANN-LEHMANN, R.; CATTORI, V.; TANDON, R.; BORETTI, F.S.; MELI, M.L.; RIOND, B.; LUTZ, H. (2008). How molecular methods change our views of FeLV infection and vaccination. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 123(1-2):119-23. doi: 10.1016/j.vetimm.2008.01.017.

HOFMANN-LEHMANN, R; HARTMANN, K. (2020). Feline leukemia virus infection: A practical approach to diagnosis. *Journal of Feline Medicine and Surgery*. 22(9):831-846. doi:10.1177/1098612X20941785

HOHDATSU T, YAMADA M, TOMINAGA R, MAKINO K, KIDA K, KOYAMA H. (1998). Antibody-dependent enhancement of feline infectious peritonitis virus infection in feline alveolar macrophages and human monocyte cell line U937 by serum of cats experimentally or naturally infected with feline coronavirus. *The Journal of Veterinary Medical Science*. 60(1):49-55.

HOSIE, M.J.; ADDIE, D.; BELÁK, S.; BOUCRAUT-BARALON, C.; EGBERINK, H.; FRYMUS GRUFFYDD-JONES, T.; HARTMANN, K.; LLORET, A.; LUTZ, H.; MARSILIO, F.; PENNISI, M.G.; RADFORD, A.D.; THIRY, E.; TRUYEN, U.; HORZINEK, M.C. (2009). Feline immunodeficiency: ABCD guidelines on prevention and management. *Journal of Feline Medicine and Surgery*. 11(7):575-84. doi: 10.1016/j.jfms.2009.05.006.

HOOVER. E.A.; MULLINS, J.I. (1991). Feline leukemia virus infection and diseases. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 199(10):1287-97.

JARRETT, O.; RUSSEL P. H. (1978). Differential growth and transmission in cats of feline leukemia viruses of subgroups A and B. *International Journal of Cancer*. v.21, n.4, p.466-472.

JARRETT, O. (1999). Strategies of retrovirus survival in the cat. *Veterinary Microbiology*, v.69, p. 99-107.

JARRETT, W.F.; CRAWFORD, E.M.; MARTIN, W.B.; DAVIE, F. (1964). A virus-like particle associated with Leukemia (Lymphosarcoma). *Nature*. 9;202:567-9. doi: 10.1038/202567a0.

JOHNSON, C.M., SELLESETH, D.W., ELLIS, M.N., CHILDERS, T.A., TOMPKINS, M.B., TOMPKINS, W.A., (1995). Reduced provirus burden and enhanced humoral immune function in AZT-treated SCID-feline mice inoculated with feline immunodeficiency virus. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 46, 169–180.

JORDAN, H. L., J. HOWARD, R. K. SELLON, D. E. WILDT, W. A. TOMPKINS, AND S. KENNEDY-STOSKOPF. (1996). Transmission of feline immunodeficiency virus in domestic cats via artificial insemination. *Journal of Virology*. 70:8224-8228.

JORDAN, H.L.; HOWARD, J.; BARR, M.C.; KENNEDY-STOSKOPF, S.; LEVY, J.K.; TOMPKINS, W.A. (1998). Feline immunodeficiency virus is shed in semen from experimentally and naturally infected cats. *AIDS Research and Human Retroviruses*. 14(12):1087-92. doi: 10.1089/aid.1998.14.1087.

KANN, R.K.; KYAW-TANNER, M.T.; SEDDON, J.M.; LEHRBACH, P.R.; ZWIJNENBERG, R.J.; MEERS, J. (2006). Molecular subtyping of feline immunodeficiency virus from domestic cats in Australia. *Australian Veterinary Journal*. 84:112–16.

KAKINUMA, S.; MOTOKAWA, W.; HOHDATSU, T.; YAMAMOTO, J.K.; KOYAMA, H.; HASHIMOTO, H. (1995). Nucleotide sequence of feline immunodeficiency virus: classification of Japanese isolates into two subtypes which are distinct from non-Japanese subtypes. *Journal of Virology*. 69(6):3639-3646.

KAWASAKI, J.; NISHIGAKI, K. (2018). Tracking the continuous evolutionary processes of an endogenous retrovirus of the domestic cat: ERV-DC. *Viruses* 10:179. doi:10.3390/v10040179.

KENYON, J.C.; LEVER, A.M.L. (2011). The molecular biology of feline immunodeficiency virus. *Viruses*. 3:2193-2213.

KLEIN, D. Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. (2002) *Trends in Molecular Medicine*. 8(6):257-60. doi: 10.1016/s1471-4914(02)02355-9.

KLEIN, D.; JANDA, P.; STEINBORN, R.; MÜLLER, M.; SALMONS, B.; GÜNZBURG, W.H. (1999). Proviral load determination of different feline immunodeficiency virus isolates using real-time polymerase chain reaction: influence of mismatches on quantification. *Electrophoresis*. 20(2):291-9. doi: 10.1002/(SICI)1522-2683(19990201)20:2<291::AID-ELPS291>3.0.CO;2-R.

KLEIN, D.; LEUTENEGGER, C.M.; BAHULA, C.; GOLD, P.; HOFMANN-LEHMANN, R.; SALMONS, B.; LUTZ, H.; GUNZBURG, W.H. (2001). Influence of preassay and sequence variations on viral load determination by a multiplex real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction for feline immunodeficiency virus. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*. 26(1):8-20. doi: 10.1097/00126334-200101010-00002.

KOLENDA-ROBERTS, H.M.; KUHN, L.A.; JENNINGS, R.N.; MERGIA, A.; GENGOZIAN, N.; JOHNSON, C.M. (2007). Immunopathogenesis of feline immunodeficiency virus infection in the fetal and neonatal cat. *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library*. 12,3668–82.

KRUPOVIC, M.; BLOMBERG, J.; COFFIN, J.M.; DASGUPTA, I.; FAN, H.; GEERING, A.D.; GIFFORD, R.; HARRACH, B.; HULL, R.; JOHNSON, W.; KREUZE, J.F.; LINDEMANN, D.; LLORENS, C.; LOCKHART, B.; MAYER, J.; MULLER, E.; OLSZEWSKI, N.E.; PAPPU, H.R.; POOGGIN, M.M.; RICHERT-PÖGGELER, K.R.; SABANADZOVIC, S.; SANFAÇON, H.; SCHOELZ, J.E.; SEAL, S.; STAVOLONE, L.; STOYE, J.P.; TEYCHENEY, P.Y.; TRISTEM, M.; KOONIN, E.V.; KUHN, J.H. (2018). Ortervirales: New Virus Order Unifying Five Families of Reverse-Transcribing Viruses. *Journal of Virology*. 29;92(12):e00515-18. doi: 10.1128/JVI.00515-18.

LACERDA, L.C.; SILVA, A.N.; FREITAS, J.S.; CRUZ, R.D.S.; SAID, R.A.; MUNHOZ, A.D. (2017). Feline immunodeficiency virus and feline leukemia virus: Frequency and associated factors in cats in northeastern Brazil. *Genetics and Molecular Research*. 16:1–8. doi: 10.4238/gmr16029633.

LACHAROJE, S.; TECHANGAMSUWAN, S.; CHAICHANAWONGSAROJ, N. (2021). Rapid characterization of feline leukemia virus infective stages by a novel nested recombinase polymerase amplification (RPA) and reverse transcriptase-RPA. *Scientific Reports*. Nov 11;11(1):22023. doi: 10.1038/s41598-021-01585-9.

LARA, M.V.; TANIWAKI, S.A.; ARAÚJO Jr., J.P. (2007). Caracterização filogenética de amostras do vírus da imunodeficiência felina (FIV) do Estado de São Paulo. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. v.27, n.11, p.467-470.

- LAPPALAINEN T, SCOTT AJ, BRANDT M, HALL IM. (2019). Genomic Analysis in the Age of Human Genome Sequencing. *Cell*. Mar 21;177(1):70-84. doi: 10.1016/j.cell.2019.02.032.
- LEE, I.T.; LEVY, J.K.; GORDMAN, S.P.; CRAWFORD, P.C.; SLATER, M.R. (2002). Prevalence of feline leukemia virus infection and serum antibodies against feline immunodeficiency virus in unowned free-roaming cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 220, 620 – 622.
- LEITE, R.C.; REIS, J.K.P.; OLIVEIRA, A.P.; NASCIMENTO, P.M.P.; OLIVEIRA, F.G.; NAVES, J.H.F.F.; RODRIGUES, A.P.S.; GASPARINI, M.R.; ALVES, F.; OLIVEIRA, C.H.S.; RAJÃO, D.S.; GALINARI, G.C.F. (2013). Retrovíroses dos animais domésticos. *Veterinária e Zootecnia*. 20:73- 92.
- LEVY, J.K.; SCOTT, H.M.; LACHTARA, J.L.; CRAWFORD, P.C. (2006). Seroprevalence of feline leukemia virus and feline immunodeficiency virus infection among cats in North America and risk factors for seropositivity. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. v.228, n.3, p.371-376.
- LEVY, L.S. (2008). Advances in understanding molecular determinants in FeLV pathology. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 123:14–22. doi:10.1016/j.vetimm.2008.01.008.
- LEVY, J.; CRAWFORD, C.; HARTMANN, K.; HOFMANNLEHMANN, R.; LITTLE, S.; SUNDAHL, E.; THAYER, V. (2008). American Association of Feline Practitioners' feline retrovirus management guidelines. *Journal of Feline Medicine and Surgery*. 10, 300-316.
- LEVY, J.K.; CRAWFORD, P.C.; TUCKER, S.J. (2017). Performance of 4 Point-of-Care Screening Tests for Feline Leukemia Virus and Feline Immunodeficiency Virus. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. Mar;31(2):521-526. doi: 10.1111/jvim.14648.
- LEVY, S.E.; BOONE, B.E. (2019). Next-Generation Sequencing Strategies. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. Jul 1;9(7):a025791. doi: 10.1101/cshperspect.a025791.
- LEUTENEGGER, C.M.; KLEIN, D.; HOFMANN-LEHMANN, R.; MISLIN, C.; HUMMEL, U.; BÖNI, J.; BORETTI, F.; GUENZBURG, W.H.; LUTZ, H. (1999). Rapid feline immunodeficiency virus provirus quantitation by polymerase chain reaction using the TaqMan fluorogenic real-time detection system. *Journal of Virological Methods*. 78(1-2):105-16. doi: 10.1016/s0166-0934(98)00166-9.
- LEWIS, J.S.; LOGAN, K.A.; ALLDREDGE, M.W.; CARVER, S.; BEVINS, S.N.; LAPPIN, M.; VANDEWOUDE, S.; CROOKS, K.R. (2017). The effects of demographic, social, and environmental characteristics on pathogen prevalence in wild felids across a gradient of urbanization. *PLoS One*. Nov 9;12(11):e0187035. doi: 10.1371/journal.pone.0187035.
- LITTLE, S.; BIENZLE, D.; CARIOTO, L.; CHISHOLM, H.; O'BRIEN, E.; SCHERK, M. (2011). Feline leukemia virus and feline immunodeficiency virus in Canada: recommendations for testing and management. *The Canadian Veterinary Journal*. 52(8):849-55.
- LITTLE, E. (2016). O Gato - Medicina Interna. Rio de Janeiro: Roca: Grupo GEN, 2016. 9788527729468. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788527729468/>. Acesso em: 22 jul. 2022.

- LITTLE, S.; LEVY, J.; HARTMANN, K.; HOFMANN-LEHMANN, R.; HOSIE, M.; OLAH, G.; DENIS, K.S. (2020). 2020 AAFP Feline Retrovirus Testing and Management Guidelines. *Journal of Feline Medicine and Surgery*. 22(1):5-30. doi: 10.1177/1098612X19895940.
- LUACES, I.; DOMENECH, A.; GARCÍA-MONTIJANO, M.; COLLADO, V. M.; SÁNCHEZ, C.; TEJERIZO, J.G.; GALKA, M.; FERNÁNDEZ, P.; GÓMEZ-LUCÍA, E. (2008). Detection of Feline leukemia virus in the endangered Iberian lynx (*Lynx pardinus*). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 20(3):381-5. doi: 10.1177/104063870802000325.
- LUTZ, H.; ADDIE, D.; BELÁK, S.; BOUCRAUT-BARALON, C.; EGBERINK, H. FRYMUS, T.; GRUFFYDD-JONES, T.; HARTMANN, K.; HOSIE, M.J.; LLORET, A.; MARSILIO, F.; PENNISI, M.G.; RADFORD, A.D.; THIRY, E.; TRUYEN, U.; HORZINEK, M.C. (2009). Feline leukemia ABCD guidelines on prevention and management. *Journal of Feline Medicine and Surgery*. 11(7):565-74. doi: 10.1016/j.jfms.2009.05.005.
- MACKEY, L.; JARRETT, W.; JARRETT, O.; LAIRD, H. (1975). Anemia associated with feline leukemia virus infection in cats. *Journal of the National Cancer Institute*. 54(1):209-216.
- MAJOR, A.; CATTORI, V.; BOENZLI, E.; RIOND, B.; OSSENT, P.; MELI, M. L.; HOFMANN-LEHMANN, R.; LUTZ, H. (2010). Exposure of cats to low doses of FeLV: seroconversion as the sole parameter of infection. *Veterinary research*. 41(2):17. doi: 10.1051/vetres/2009065.
- MANI, K.; THIRUMALMUTHU, K.; KATHIRESAN, D.S.; RAMALINGAM, S.; SANKARAN, R.; JEYARAJ, S. (2021). In-silico analysis of Covid-19 genome sequences of Indian origin: Impact of mutations in identification of SARS-Co-V2. *Molecular and Cellular Probes*. Aug;58:101748. doi: 10.1016/j.mcp.2021.101748
- MARUYAMA, S.; KABEYA, H.; NAKAO, R.; TANAKA, S.; SAKAI, T.; XUAN, X.; KATSUBE, Y.; MIKAMI, T. (2003). Seroprevalence of Bartonella henselae, Toxoplasma gondii, FIV and FeLV infections in domestic cats in Japan. *Microbiology Immunology*. 47:147-53.
- MARTINS, A.N.; MEDEIROS, S.O.; SIMONETTI, J.P.; SCHATZMAYR, H.G.; TANURI, A.; BRINDEIRO, R.M. (2008). Phylogenetic and genetic analyses of feline immunodeficiency virus gag, pol and env genes from domestic cats undergoing nucleoside reverse transcriptase inhibitor treatment or treatment-naïve in Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Virology*. 82(16):7863-74. doi: 10.1128/JVI.00310-08.
- MARTINS, N.D.S.; RODRIGUES, A.P.S.; DA LUZ, L.A.; DOS REIS, L.D.L.; DE OLIVEIRA, R.M.; DE OLIVEIRA, R.A.; ABREU-SILVA, A.L.; DOS REIS, J.K.P.; MELO, F.A. (2018). Feline immunodeficiency virus subtypes B and A in cats from São Luis, Maranhão, Brazil. *Archives of Virology*. 163(2):549-554. doi: 10.1007/s00705-017-3636-2.
- MARÇOLA, T.G.; GOMES, C.P.C.; SILVA, P.A.; FERNANDES, G.R.; PALUDO, G.R.; PEREIRA, R.W. (2013). Identification of a novel subtype of feline immunodeficiency virus in a population of naturally infected felines in the Brazilian Federal District. *Virus Genes*. 46(3):546-50. doi: 10.1007/s11262-013-0877-3.
- MCLUCKIE, A; BARRS, V.; LINDSAY, S.; AGHAZADEH, M.; SANGSTER, C.; BEATTY, J.A. (2018). Molecular diagnosis of Felis catus gammaherpesvirus 1 (FcaGHV1) infection in cats of known retrovirus status with and without lymphoma. *Viruses*. 10(3):128. doi: 10.3390/v10030128.

MEDEIROS, S.O.; SILVA, B.J.A.; CARNEIRO, A.L.; FERREIRA JÚNIOR, O.C.; TANURI, A. (2019). 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. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-10111>

MELI, M.L.; CATTORI, V.; MARTÍNEZ, F.; LÓPEZ, G.; VARGAS, A.; SIMÓN, M.A.; ZORRILLA, I.; MUÑOZ, A.; PALOMARES, F.; LÓPEZ-BAO, J.V.; PASTOR, J.; TANDON, R.; WILLI, B.; HOFMANN-LEHMANN, R.; LUTZ, H. (2009). Feline leukemia virus and other pathogens as important threats to the survival of the critically endangered Iberian lynx (*Lynx pardinus*). *PLoS One*. 4(3):e4744. doi: 10.1371/journal.pone.0004744.

MELI, M.L.; CATTORI, V.; MARTÍNEZ, F.; LÓPEZ, G.; VARGAS, A.; PALOMARES, F.; LÓPEZ-BAO, J.V.; HOFMANN-LEHMANN, R.; LUTZ, H. (2010) Feline leukemia virus infection: a threat for the survival of the critically endangered Iberian lynx (*Lynx pardinus*). *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 134(1-2):61-7. doi: 10.1016/j.vetimm.2009.10.010.

MIYAKE, A.; WATANABE, S.; HIRATSUKA, T.; ITO, J.; NGO, M.H.; MAKUNDI, I.; KAWASAKI, J.; ENDO, Y.; TSUJIMOTO, H.; NISHIGAKI, K. (2016) Novel feline leukemia virus interference group based on the env Gene. *Journal of Virology*. 90(9):4832-4837. doi: 10.1128/JVI.03229-15.

MIYAKE, A.; KAWASAKI, J.; NGO, H.; MAKUNDI, I.; MUTO, Y.; KHAN, A. H.; SMITH, D. J.; NISHIGAKI, K. (2019). Reduced Folate Carrier: an Entry Receptor for a Novel Feline Leukemia Virus Variant. *Journal of virology*. 93(13)e00269-19. <https://doi.org/10.1128/JVI.00269-19>.

MIYAZAWA, T.; JARRET, O. (1997). Feline leukemia virus proviral DNA detected by polymerase chain reaction in antigenemic but nonviremic ('discordant') cats. *Archives of Virology*. 142(2):323-32. doi: 10.1007/s007050050079.

MIYAZAWA, T. (2002). Infections of feline leukemia virus and feline immunodeficiency virus. *Frontiers in Bioscience*. 7:d504-18. doi: 10.2741/A791.

NEIL, J. C.; FULTON, R.; RIGBY, M.; STEWART, M. (1991). Feline leukemia virus: generation of pathogenic and oncogenic variants. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 171:67-93. doi: 10.1007/978-3-642-76524-7_4.

NEEL, B.G.; HAYWARD, W.S.; ROBINSON, H.L.; FANG, J.; ASTRIN, S.M. (1981). Avian leukosis virus-induced tumors have common proviral integration sites and synthesize discrete new RNAs: oncogenesis by promoter insertion. *Cell*. 23(2):323-34. doi: 10.1016/0092-8674(81)90128-8.

NESINA, S.; HELFER-HUNGERBUEHLER, A.K.; RIOND, B.; BORETTI, F.S.; WILLI, B.; MELI, M.L.; GREY, P.; HOFMANN-LEHMANN, R. (2015). Retroviral DNA – the silent winner: blood transfusion containing latent feline leukemia provirus causes infection and disease in naive recipient cats. *Retrovirology*. 12:105. doi: 10.1186/s12977-015-0231-z.

NGO, M.H.; ARNAL, M.; SUMI, R.; KAWASAKI, J.; MIYAKE, A.; GRANT, C.K.; OTOI, T.; FERNÁNDEZ DE LUCO, D.; NISHIGAKI, K. (2019). Tracking the Fate of Endogenous Retrovirus Segregation in Wild and Domestic Cats. *Journal of Virology*. Nov 26;93(24):e01324-19. doi: 10.1128/JVI.01324-19. PMID: 31534037; PMCID: PMC6880155.

NORRIS, J.M.; BELL, E.T.; HALES, L.; TORIBIO, J.A.; WHITE, J.D.; WIGNEY, D.I.; BARAL, R.M.; MALIK, R. (2007). Prevalence of feline immunodeficiency virus infection in domesticated and

feral cats in eastern Australia. *Journal of Feline Medicine and Surgery*. 9(4):300-8. doi: 10.1016/j.jfms.2007.01.007.

NORSWORTHY ET AL., G. D.; CRYSTAL, M. A.; NORSWORTHY ET AL., S. F.; TILLEY, L. P. (2004). O Paciente Felino. 2ª ed. São Paulo: *Ed. Manole*. p.248-252.

O'BRIEN, S.J.; TROYER, J.L.; BROWN, M.A.; JOHNSON, W.E.; ANTUNES, A.; ROELKE, M.E.; PECON-SLATTERY, J. (2012). Emerging viruses in the Felidae: shifting paradigms. *Viruses*. 2012 Feb;4(2):236-57. doi: 10.3390/v4020236.

O'CONNOR, T.P. JR.; TONELLI, QJ, SCARLETT JM. (1991). Report of the National FeLV/FIV Awareness Project. *Journal of American Veterinary Medical Association*. 15;199(10):1348-53.

O'KEEFE, E.P. (2013). Nucleic acid delivery: Lentiviral and retroviral vectors. *Mater methods*. 3:174. doi: //dx.doi.org/10.13070/mm.en.3.174.

OLMSTED RA, HIRSCH VM, PURCELL RH, JOHNSON PR. (1989). Nucleotide sequence analysis of feline immunodeficiency virus: genome organization and relationship to other lentiviruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 86(20):8088-92. doi: 10.1073/pnas.86.20.8088.

ORNELAS, S.S. Inibição da replicação do vírus da leucemia felina (felv) em células cronicamente infectadas através da utilização de RNA. 2012. Tese (Pós Graduação em Patologia Molecular) – Universidade de Brasília, 2012. Disponível em: <http://repositorio.unb.br/handle/10482/11363>. Acesso em: 06/10/2022.

ORTEGA, C.; VALENCIA, A. C.; DUQUE-VALENCIA, J.; RUIZ-SAENZ, J. (2020). Prevalence and Genomic Diversity of Feline Leukemia Virus in Privately Owned and Shelter Cats in Aburrá Valley, Colombia. *Viruses*. 12(4):464. doi: 10.3390/v12040464.

OSTROWSKI, S.; VAN VUUREN, M.; LENAIN, D. M.; DURAND, A. (2003). A Serologic Survey of Wild Felids from Central West Saudi Arabia. *Journal of Wildlife Diseases*. 39(3)696–701.

OVERBAUGH, J.; BANGHAM, C.R. (2001). Selection forces and constraints on retroviral sequence variation. *Science*. 292(5519):1106-9. doi: 10.1126/science.1059128.

PANDEY, R.; GHOSH, A.; KUMAR, D.; BACHMAN, B.; SHIBATA, D.; ROY-BURMAN, P. (1991). Recombination between feline leukemia virus subgroup B or C and endogenous env elements alters the in vitro biological activities of the viruses. *Journal of Virology*. 65:6495–6508. doi: 10.1128/JVI.65.12.6495-6508.1991.

PECON-SLATTERY J, TROYER JL, JOHNSON WE, O'BRIEN SJ. (2008). Evolution of feline immunodeficiency virus in Felidae: implications for human health and wildlife ecology. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 123(1-2):32-44. doi: 10.1016/j.vetimm.2008.01.010.

PEDERSEN N.C., HO E.W., BROWN M.L., YAMAMOTO J.K. (1987). Isolation of a T-lymphotropic virus from domestic cats with an immunodeficiency-like syndrome. *Science*. 235(4790):790-3. doi: 10.1126/science.3643650.

PEDERSEN, N.C.; LEUTENEGGER, C.M.; WOO, J.; HIGGINS, J. (2001). Virulence differences between two field isolates of feline immunodeficiency virus (fiv-apetaluma and fiv-cpgammar) in

young adult specific pathogen free cats. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 79(1-2):53-67. doi: 10.1016/s0165-2427(01)00252-5.

PERRY, L.; HEARD, P.; KANE, M.; KIM, H.; SAVIKHIN, S.; DOMINGUEZ, W. et al. (2007). Application of multiplex polymerase chain reaction to the detection of pathogens in food. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology*. v.15, n.2, p.176-198.

PHIPPS, A.J.; HAYES, K.A.; AL-DUBAID, M.; ROY-BURMAN, P.; MATHES, L.E. (2000). Inhibition of feline leukemia virus subgroup A infection by coinubation with subgroup B. *Virology*. 277(1):40-7. doi: 10.1006/viro.2000.0606.

POLANI, S.; ROCA, A.L.; ROSENSTEEL, B.B.; KOLOKOTRONIS, S.O.; BAR-GAL, G.K. (2010). Evolutionary dynamics of endogenous feline leukemia virus proliferation among species of the domestic cat lineage. *Virology*. 405(2):397–407. doi:10.1016/j.virol.2010.06.010.

POWERS, J. A.; CHIU, E. S.; KRABERGER, S. J.; ROELKE-PARKER, M.; LOWERY, I.; ERBECK, K.; TROYER, R.; CARVER, S.; VANDEWOUDE, S. (2018). 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. doi: 10.1128/JVI.00649-18.

RAPPOLEE, D.A.; BRENNER, C.A.; SCHULTZ, R.; MARK, D.; WERB, Z. (1988a). Developmental expression of PDGF, TGF-alpha, and TGF-beta genes in preimplantation mouse embryos. *Science*. 241(4874):1823-5. doi: 10.1126/science.3175624.

RAPPOLEE, D.A.; MARK, D.; BANDA, M.J.; WERB, Z. (1988b) Wound macrophages express TGF-alpha and other growth factors in vivo: analysis by mRNA phenotyping. *Science*. 241(4866):708-12. doi: 10.1126/science.3041594.

RAVAZZOLLO, A. P.; DA COSTA, U. (2007). Retroviridae. In: FLORES, E. F. *Virologia Veterinária*. 1ª ed. Santa Maria: UFSM. p.811-836.

REID, R.W.; BARR, M.C.; SCOTT, F.W. (1992). Retrospective serologic survey for the presence of feline immunodeficiency virus antibody: a comparison of ELISA and IFA techniques. *The Cornell Veterinarian*. 82(4):359–69.

ROJKO, J.L.; HOOVER, E.A.; MATHES, L.E.; OLSEN, R.G.; SCHALLER, J.P. (1979). Pathogenesis of experimental feline leukemia virus infection. *Journal of the National Cancer Institute*. 63(3):759-68. doi: 10.1093/jnci/63.3.759.

ROZÌERES, S.; THOMPSON, J.; SUNDSTROM, M.; GRUBER, J.; STUMP, D.S.; PARSEVAL, A.P.; WOUDE, S.V.; ELDER, J.H. (2008). Replication properties of clade A/C chimeric feline immunodeficiency viruses and evolution of infection kinetics in the domestic cat. *Journal of Virology*. 82(16):7953-63. doi: 10.1128/JVI.00337-08.

SAHU, B.; SINGH, S.D.; BEHERA, B.K.; PANDA, S.K.; DAS, A.; PARIDA, P.K. Rapid detection of Salmonella contamination in seafoods using multiplex PCR. (2019). *Brazilian Journal of Microbiology*. 50(3):807-816. doi: 10.1007/s42770-019-00072-8.

SAND, C.; ENGLERT, T.; EGBERINK, H.; LUTZ, H.; HARTMANN, K. (2009). Evaluation of a new in-clinic test system to detect feline immunodeficiency virus and feline leukemia virus infection. *Veterinary Clinical Pathology*. 39(2):210-4. doi: 10.1111/j.1939-165X.2009.00196.x.

SCHERK, M.A.; FORD, R.B.; GASKELL, R.M.; HARTMANN, K.; HURLEY, K.F.; LAPPIN, M.R.; LEVY, J.K.; LITTLE, S.E.; NORDONE, S.K.; SPARKES, A.H. (2013a). 2013 AAFP Feline Vaccination Advisory Panel Report: Disease information fact sheet: feline immunodeficiency virus. *Journal of Feline Medicine and Surgery*. 15(9):785–808.

SELLON, R.K.; HARTMANN, K. (2012). Feline immunodeficiency virus infection. In: Greene CE (ed). *Infectious diseases of the dog and cat*. 4th ed. St Louis, MO: Elsevier Saunders, 2012, pp 136–149.

SERPELL, J.A. (2000). The domestication and history of the cat. In: Turner DC, Bateson P. editors. *The domestic cat: the biology of its behaviour*. Cambridge: Cambridge University Press; p. 180-192.

SILVA, C. P.; ONUMA, S. S.; DE AGUIAR, D. M.; DUTRA, V.; NAKAZATO, L. (2016). 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*. 20(3):316-7. doi: 10.1016/j.bjid.2016.01.005.

SIVAGURUNATHAN, A.; ATWA, A.M.; LOBETTI, R. (2018). Prevalence of feline immunodeficiency virus and feline leukemia virus infection in Malaysia: A retrospective study. *JFMS Open Reports*. 4(1):2055116917752587. doi: 10.1177/2055116917752587.

SOBRINHO, L.S.V.; VIDES, J.P.; BRAGA, E.T.; GOMES, A.A.D.; ROSSI, C.N.; MARCONDES M. (2011). Sorofrequência de infecção pelo vírus da imunodeficiência felina e vírus da leucemia felina em gatos do município de Araçatuba, São Paulo. *Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science*. 48(5):378-383.

SODORA, D.; SCHPAER, E.; KITCHELL, B.; DOW, S.; HOOVER, E.; MULLINS, J. (1994). Identification of three feline immunodeficiency virus (FIV) env gene subtypes and comparison of the FIV and human immunodeficiency virus type 1 evolutionary patterns. *Journal of Virology*. 68(4):2230-8. doi: 10.1128/JVI.68.4.2230-2238.1994.

SONG, N.; JO, H.; CHOI, M.; KIM, J.H.; SEO, H.G.; CHA, S.Y.; SEO, K.; PARK, C. (2013). Identification and classification of feline endogenous retroviruses in the cat genome using degenerate PCR and in silico data analysis. *The Journal of General Virology*. 94(Pt 7):1587-1596. doi: 10.1099/vir.0.051862-0.

SOUZA, H.J.M.; TEIXEIRA, C.H.R. (2003). *Medicina e Cirurgia Felina*. 1ª ed. Rio de Janeiro: Ed. Lf Livros. 475p.

STAEHELIN, D.; VARMUS, H.E.; BISHOP, J.M.; VOGT, P.K. (1976). *Nature*. 260, 170-173.

STEINRIGL A.; KLEIN D. (2003). Phylogenetic analysis of feline immunodeficiency virus in Central Europe: a prerequisite for vaccination and molecular diagnostics. *The Journal of General Virology*. 84(Pt 5):1301-1307. doi: 10.1099/vir.0.18736-0.

STEWART, M.A.; WARNOCK, M.; WHEELER, A.; WILKIE, N.; MULLINS, J.I.; ONIONS, D.E.; NEIL, J.C. (1986). 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):825-34. doi: 10.1128/JVI.58.3.825-834.1986.

STUTZER, B.; MULLER, F.; MAJZOUB, M.; LUTZ, H.; GREENE, C.E.; HERMANN, W.; HARTMANN, K. (2010). Role of latent feline leukemia virus infection in nonregenerative cytopenias of cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 24(1):192-7. doi: 10.1111/j.1939-1676.2009.0417.x.

STUTZER, B.; SIMON, K.; LUTZ, H.; MAJZOUB, M.; HERMANN, W.; HIRSCHBERGER, J.; SAUTER-LOUIS, C.; HARTMANN, K. (2011). Incidence of persistent viraemia and latent feline leukemia virus infection in cats with lymphoma. *Journal of Feline Medicine and Surgery*. 13(2):81-7. doi: 10.1016/j.jfms.2010.09.015.

SYKES, J. E.; HARTMANN, K. (2013). Feline Leukemia Virus Infection. Canine and Feline Infectious Diseases. *Elsevier*. 224–38. doi: 10.1016/B978-1-4377-0795-3.00022-3.

TANDON, R.; CATTORI, V.; GOMES-KELLER, M.A.; MELI, M.L.; GOLDBERGER, M.C.; LUTZ, H.; HOFMANN-LEHMANN, R. (2005). Quantitation of feline leukemia virus viral and proviral loads by TaqMan real-time polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods*. 130(1-2):124-32. doi: 10.1016/j.jviromet.2005.06.017.

TANDON, R.; CATTORI, V.; WILLI, B.; LUTZ, H.; HOFMANN-LEHMANN, R. (2008). Quantification of endogenous and exogenous feline leukemia virus sequences by real-time PCR assays. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 123(1-2):129-33. doi: 10.1016/j.vetimm.2008.01.027.

TEIXEIRA, B.M.; LOGAN, N.; SAMMAN, A.; MIYASHIRO, S.I.; BRANDÃO, P.E.; WILLETT, B.J.; HOSIE, M.J.; HAGIWARA, M.K. (2011). Isolation and partial characterization of Brazilian samples of feline immunodeficiency virus. *Virus Research*. 160(1-2):59-65. doi: 10.1016/j.virusres.2011.05.007.

TEIXEIRA, B.M.; HAGIWARA, M.K.; CRUZ, J.C.M.; HOSIE, M.J. (2012). Feline Immunodeficiency Virus in South America. *Viruses*. 4(3):383-96. doi: 10.3390/v4030383.

TEIXEIRA, B.M.; TANIWAKI, S.A.; MENEZES, P.M.M.; RODRIGUES, A.K.P.P.; MOUTA, A.N.; ARCEBISPO, T.L.M.; BRAZ, G.F.; DA CRUZ, J.C.M.; BRANDÃO, P.E.; HEINEMANN, M.B.; SILVA, M.X.; HOSIE, M.J. (2019). Feline immunodeficiency virus in Northern Ceará, Brazil. *Journal of Feline Medicine and Surgery Open Reports*. 8;5(2):2055116919859112. doi: 10.1177/2055116919859112.

TORRES, A.N.; MATHIASON, C.K.; HOOVER, E.A. (2005). Re-examination of feline leukemia virus: host relationships using real-time PCR. *Virology*. 332(1):272-83. doi: 10.1016/j.virol.2004.10.050.

TORRES, A.N.; O'HALLORAN, K.P.; LARSON, L.J.; SCHULTZ, R.D.; HOOVER, E.A. (2010). Feline leukemia virus immunity induced by whole inactivated virus vaccination. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 134(1-2):122-31. doi: 10.1016/j.vetimm.2009.10.017.

TROYER, J.L.; PECON-SLATTERY, J.; ROELKE, M.E.; JOHNSON, W.; VANDEWOUDE, S.; VAZQUEZ-SALAT, N.; BROWN, M.; FRANK, L.; WOODROFFE, R.; WINTERBACH, C.; WINTERBACH, H.; HEMSON, G.; BUSH, M.; ALEXANDER, K.A.; REVILLA, E.; O'BRIEN, S.J. (2005). Seroprevalence and genomic divergence of circulating strains of feline immunodeficiency virus among Felidae and Hyaenidae species. *Journal of Virology*. 79(13):8282-94. doi: 10.1128/JVI.79.13.8282-8294.2005.

- VARMUS, H.E. (1984). The molecular genetics of cellular oncogenes. *Annual Review of Genetics*. 18:553-612. doi: 10.1146/annurev.ge.18.120184.003005.
- VAN WEEZEP, E.; KOOI, E.A.; VAN RIJN, P.A. (2019). PCR diagnostics: In silico validation by an automated tool using freely available software programs. *Journal of Virological Methods*. Aug;270:106-112. doi: 10.1016/j.jviromet.2019.05.002.
- VOBIS, M.; D'HAESE, J.; MEHLHORN, H.; MENCKE, N. (2003). Evidence of horizontal transmission of feline leukemia virus by the cat flea (*Ctenocephalides felis*). *Parasitology Research*. 91(6):467-70. doi: 10.1007/s00436-003-0949-8.
- WANG, C.; JOHNSON, C.M.; AHLUWALIA, S.K.; JOHNSON, C.M.; AHLUWALIA, S.K.; CHOWDHURY, E.; LI, Y.; GAO, D.; POUDEL, A.; RAHMAN, K.S.; KALTENBOECK, B. (2010). Dual-emission fluorescence resonance energy transfer (FRET) real-time PCR differentiates feline immunodeficiency virus subtypes and discriminates infected from vaccinated cats. *Journal of Clinical Microbiology*. 48(5):1667-1672. doi:10.1128/JCM.00227-10
- WANAGURU, M.; BARRY, D.J.; BENTON, D.J.; O'REILLY, N.J.; BISHOP, K.N. (2018). Murine leukemia virus p12 tethers the capsid-containing pre-integration complex to chromatin by binding directly to host nucleosomes in mitosis. *PLoS Pathogens*. 14(6):e1007117. doi: 10.1371/journal.ppat.1007117.
- WEAVER, E.A. A detailed phylogenetic analysis of FIV in the United States. *PLoS One*. 9;5(8):e12004. doi: 10.1371/journal.pone.0012004.
- WESTMAN, M.E.; MALIK, R.; HALL, E.; SHEEHY, P.A.; NORRIS, J.M. (2015). Determining the feline immunodeficiency virus (FIV) status of FIV-vaccinated cats using point-of-care antibody kits. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 42:43-52. doi: 10.1016/j.cimid.2015.07.004.
- WESTMAN, M.E.; MALIK, R.; NORRIS, J.M. (2019). Diagnosing feline immunodeficiency virus (FIV) and feline leukemia virus (FeLV) infection: an update for clinicians. *Australian Veterinary Journal*. 97(3):47-55. doi: 10.1111/avj.12781. Erratum in: *Australian Veterinary Journal*. 97(9):371.
- WESTMAN, M.E.; COGGINS, S.J.; VAN DORSSELAER, M.; NORRIS, J.M.; SQUIRES, R.A.; THOMPSON, M.; MALIK, R. (2022). Feline immunodeficiency virus (FIV) infection in domestic pet cats in Australia and New Zealand: Guidelines for diagnosis, prevention and management. *Australian Veterinary Journal*. May 16. doi: 10.1111/avj.13166.
- WILLETT, B.J.; HOSIE, M.J. (2013). Feline leukemia virus: half a century since its discovery. *The Veterinary Journal*. 195(1):16-23. doi: 10.1016/j.tvjl.2012.07.004.
- YAMAMOTO, J.K.; HANSEN, H.; HO, E.W.; MORISHITA, T.Y.; OKUDA, T.; SAWA, T.R.; NAKAMURA, R.M.; PEDERSEN N.C. (1989). Epidemiologic and clinical aspects of feline immunodeficiency virus infection in cats from the continental United States and Canada and possible mode of transmission. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 194, 213 – 220.
- YAMAMOTO, J.K.; SANOU, M.P.; ABBOTT, J.R.; COLEMAN, J.K. (2010). Feline immunodeficiency virus model for designing HIV/AIDS vaccines. *Current HIV Research*. Jan;8(1):14-25. doi: 10.2174/157016210790416361.
- ZHANG, H.; MORRISON, S.; TANG, Y.W. (2015). Multiplex polymerase chain reaction tests for

detection of pathogens associated with gastroenteritis. *Clinics in Laboratory Medicine*. 35(2):461-86. doi: 10.1016/j.cll.2015.02.006.

ZORTÉA, V.M. (2019). Infecção secundária ao vírus da leucemia felina em gato domiciliado: relato de caso. *Trabalho de Conclusão de Curso em Medicina Veterinária – UFSC – Curitibanos*, 2019. 42 p.

ZULCH, M.F.; PILOTTE, N.; GRANT, J.R.; MINETTI, C.; REIMER, L.J.; WILLIAMS, S.A. (2020). Selection and exploitation of prevalent, tandemly repeated genomic targets for improved real-time PCR-based detection of *Wuchereria bancrofti* and *Plasmodium falciparum* in mosquitoes. *PLoS One*. May 1;15(5):e0232325. doi: 10.1371/journal.pone.0232325.

ANEXOS

ANEXO I: Formulário e termo de autorização de coleta:

Eu autorizo a coleta de sangue através de punção da jugular do felídeo sob minha tutoria para o projeto de Mestrado em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, da aluna Diezza Biondo, intitulado “ANÁLISES DE DIVERSIDADE GENÉTICA E PADRONIZAÇÃO DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR PARA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE RETROVÍRUS FELINOS” sob coordenação dos Professores e Doutores Vagner Ricardo Lunge e Prof. Dr. André Felipe Streck.

Ao tutor:

Nome do Tutor: _____ Contato do tutor: (____) _____

Identificação da ficha: _____ Clínica: _____

Nome do felino: _____ Raça: _____

Idade: _____ Sexo: () Macho () Fêmea

Cidade: _____ Endereço: _____

Acesso à rua? _____ Castração: () Sim () Não () Não sei

Vacinado: () Sim () Não Qual vacina? () Tríplice () Quádrupla () Quíntupla

Testado para FIV e FeLV? _____ Resultado do teste () FeLV + () FeLV - () FIV + () FIV -

Reside com outros gatos? () Sim () Não Quantos? _____

Comportamento em relação aos outros indivíduos? () Dócil () Agressivo

Histórico de briga? () Sim () Não _____

O animal já foi mordido ou mordeu outro gato? () Sim () Não

O animal já recebeu transfusão sanguínea? () Sim () Não

Nascimento do felino: () Criadouro, clínica veterinária, agropecuária () Animal de rua

() Na casa onde vive () Em outro domicílio

Ao veterinário:

Estado de saúde do paciente: () Saudável () Doente () Check-up () Castração

Se doente, principais sinais clínicos encontrados: _____

Escore corporal do animal: () Caquético () Magro () Normal () Sobre peso () Obeso

ANEXO II: Materiais Suplementares dos artigos.

Material Suplementar do artigo I:

Arquivo Suplementar: - Tabela 1: Conjunto de dados WGS de 60 sequências completas do genoma de FIV baixadas do Genbank; Tabela 2: conjunto de dados do gene *env* das 62 sequências completas de FIV; Tabela 3: Resultados das sequências WGS FIV recombinantes, posteriormente retiradas do estudo filogenético; Tabela 4: Resultados das sequências completas recombinantes do gene *env* FIV, posteriormente removidas do estudo filogenético.

Link:

https://docs.google.com/spreadsheets/d/1UGykLOx4Osc4rOgyjtbl0jHIW0r_p3iku60EdWy221g/edit?usp=share_link

Material Suplementar do artigo II:

Arquivo Suplementar 1: Dados das amostras coletadas dos 100 felinos utilizados para a validação dos métodos.

Link:

<https://docs.google.com/spreadsheets/d/1AZno7eWf3LUbuJtT9OiZ9NpGuG4Cvbsz4opBoqoeC4g/edit?usp=sharing>

Arquivo Suplementar 2: Conjunto de dados dos 60 genomas completos de FIV e 20 genomas completos de FeLV.

Link:

https://docs.google.com/spreadsheets/d/1A99UVX2QBgjbm9y_eamwfuCLFxiUHjhaHRB_1AgRoJQ/edit?usp=sharing

Arquivo Suplementar 3: Análise de carga viral de amostras positivas de FIV e FeLV.

Link:

https://docs.google.com/spreadsheets/d/1eltBbIYEvc9_Y1gTWAmCM-vL1NK-uxEWmxuIjaL97DU/edit?usp=sharing