



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL

ILANNA VANESSA PRISTO DE MEDEIROS OLIVEIRA

**PESQUISA DE AGENTES VIRAIS CAUSADORES DE ABORTAMENTO,
NATIMORTALIDADE E MORTALIDADE NEONATAL EM GATAS**

MOSSORÓ

2017

ILANNA VANESSA PRISTO DE MEDEIROS OLIVEIRA

**PESQUISA DE AGENTES VIRAIS CAUSADORES DE ABORTAMENTO,
NATIMORTALIDADE E MORTALIDADE NEONATAL EM GATAS**

Dissertação apresentada ao Mestrado em
Ciência Animal do Programa de Pós-
Graduação em Ciência Animal da Universidade
Federal Rural do Semi-Árido como requisito
para obtenção do título de Mestre em Ciência
Animal.

Linha de Pesquisa: Sanidade Animal

Orientador: Prof. Dr. João Marcelo Azevedo de
Paula Antunes - UFERSA

MOSSORÓ

2017

FICHA CATALOGRÁFICA

©Todos os direitos estão reservados à Universidade Federal Rural do Semi-Árido. O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade do (a) autor (a), sendo o mesmo, passível de sanções administrativas ou penais, caso sejam infringidas as leis que regulamentam a Propriedade Intelectual, respectivamente, Patentes: Lei nº 9.279/1996, e Direitos Autorais: Lei nº 9.610/1998. O conteúdo desta obra tornar-se-á de domínio público após a data de defesa e homologação da sua respectiva ata, exceto as pesquisas que estejam vinculadas ao processo de patenteamento. Esta investigação será base literária para novas pesquisas, desde que a obra e seu (a) respectivo (a) autor (a) seja devidamente citado e mencionado os seus créditos bibliográficos.

O48p Oliveira, Ilanna Vanessa Pristo de Medeiros.
PESQUISA DE AGENTES VIRAIS CAUSADORES DE

ABORTAMENTO, NATIMORTALIDADE E MORTALIDADE

NEONATAL EM GATAS / Ilanna Vanessa Pristo de
Medeiros Oliveira. - 2017.

44 f. : il.

Orientador: João Marcelo Azevedo de Paula
Antunes.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal
Rural do Semi-árido, Programa de Pós-graduação em
Ciência Animal, 2017.

ILANNA VANESSA PRISTO DE MEDEIROS OLIVEIRA

**PESQUISA DE AGENTES VIRAIS CAUSADORES DE ABORTAMENTO,
NATIMORTALIDADE E MORTALIDADE NEONATAL EM GATAS**

Dissertação apresentada ao Mestrado em
Ciência Animal do Programa de Pós-
Graduação em Ciência Animal da Universidade
Federal Rural do Semi-Árido como requisito
para obtenção do título de Mestre em Ciência
Animal.

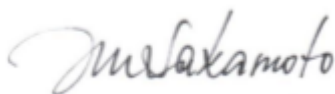
Linha de Pesquisa: Sanidade Animal

Aprovada em: 20 / 02 /2017.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. João Marcelo Azevedo de Paula Antunes (UFERSA)
(Orientador e Presidente)



Prof. Dr. Sidnei Miyoshi Sakamoto (UFERSA)
(Primeiro membro)



Dra. Larissa de Castro Demoner (UFERSA)
(Segundo membro)

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

ILANNA VANESSA PRISTO DE MEDEIROS OLIVEIRA, filha de Ilo Sérgio Fernandes de Oliveira e Ana Zélia Pristo de Medeiros Oliveira, nasceu em 09 de abril de 1987, na cidade de Natal/RN. Concluiu o ensino médio em 2004, no Colégio Nossa Senhora das Neves (em Natal). Iniciou o ensino superior em julho de 2007, na Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), onde graduou-se como Bacharel em Medicina veterinária, concluindo em julho de 2012. Durante a graduação realizou estágio voluntário no Laboratório de Anatomia dos animais domésticos, onde foi monitora (março/2008 a julho/2008); no Laboratório clínico do HOVET-UFERSA (abril/2010 a julho/2010) e Estágio supervisionado no HOVET-UFCG (fevereiro/2012). Ingressou em abril de 2015 no Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal na Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA) tendo como linha de pesquisa sanidade animal. Foi bolsista CAPES durante o período de maio/2015 até março/2017.

A Deus e a Todos que desejam meu sucesso.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, que sempre me mostrou que sou capaz e nunca me abandonou mesmo quando eu mesma estava distante dEle.

Ao meu marido, Felipe Pedro Oliveira da Silva, que em nenhum momento deixou de me apoiar e me deu todo suporte necessário para que eu nunca desistisse, inclusive aguentando todos os estresses e falta de paciência na reta final do projeto.

Aos meus pais, Ana Zélia e Ilo Sérgio, que sempre foram meus incentivadores e meu motivo de querer sempre superar todos os obstáculos que por ventura aparecessem, me devotando sempre um amor incondicional, se orgulhando de cada passo a mais que eu dava e principalmente ficando feliz com a minha felicidade.

Ao meu orientador, Dr. João Marcelo Azevedo de Paula Antunes, por sempre me incentivar e acreditar em mim mais que eu mesma, me ajudando a crescer e me proporcionando experiências engrandecedoras. E por se disponibilizar à trabalhar comigo por mais 4 anos. Serei grata por toda a vida.

Ao meu irmão, Terci César, e à minha cunhada-irmã, Lidiane Sales, por sempre estarem torcendo por mim e me devotarem uma admiração especial.

A minha irmã, Yanna Melissa, e ao meu cunhado Daniel Melo, que incentivaram, questionaram e se alegraram com minhas conquistas nessa jornada.

Aos meus avós, Terci e Célia Medeiros, que sempre estiveram em oração por mim e sempre se preocuparam e me apoiaram em todos os passos que dei.

Aos meus sobrinhos Thales Melo, Melissa Melo e Luís Arthur, que muitas vezes foram aquele incentivo que faltava para eu renovar as forças e não desistir, através dos seus gestos sinceros de crianças.

A minha família (tios e primos) que sempre torceram por mim e me ajudavam mesmo indiretamente a seguir sempre em frente.

Aos meus amigos verdadeiros, que desejam meu sucesso tanto quanto eu e que me apoiam e incentivam, seja de perto ou de longe. Em especial à Regina Valéria, que foi meu suporte em Mossoró e sempre tinha as palavras certas nas horas exatas. E além disso me concedeu o espaço físico da sua sala particular para que eu pudesse fazer minhas pesquisas e estudos.

A minha amiga Muriel Pimentel, que sempre me apoiou e mesmo de longe se preocupava comigo e com o andamento do projeto.

As minhas amigas de infância Izabele Iduino, Sarah Solino e Mariana Godeiro, juntamente com meu amigo não tão antigo assim, Mateus Amorim, que sempre estão do meu lado mesmo ausente e são incentivadores eternos do meu sucesso.

A minha amiga de mais de década, Thayana Bezerra, que mesmo odiando Mossoró e reclamando sempre da distância, me apoiou, incentivou e vibrou com cada conquista durante essa jornada.

A Débora Freire de Carvalho, minha “irmã de mestrado”, por ter caminhado lado a lado comigo nessa jornada e ter compartilhado todos os momentos desafiadores, compartilhando experiências inesquecíveis, numa verdadeira parceria.

Aos meus colegas de mestrado, que dividiram um pouco do seu tempo no dia a dia pagando disciplinas e dividindo os conhecimentos adquiridos.

Ao Dr. Raimundo Alves Barreto Júnior, por ceder gentilmente seu laboratório e disponibilizar tudo que precisávamos, sempre. E por aceitar ser membro suplente da banca examinadora.

Ao laboratório de Patologia da UFRSA, e a todos que lá trabalham, por estarem sempre dispostos à ajudar e por terem cedido espaço para realização de parte da pesquisa.

Ao professor da UNESP-Botucatu, João Pessoa Araújo Júnior, por ter disponibilizado o laboratório no qual trabalha (IBTEC) e permitir o uso de todos os materiais lá presentes para que a pesquisa fosse bem-sucedida.

A doutoranda da UNESP-Botucatu, Jacqueline Kazue, que foi minhas mãos, pés e braços durante a experiência no IBTEC, me orientando, ensinando e discutindo com toda paciência e cuidado.

A Profa. Dra. Cecília Calabuig por se disponibilizar em fazer a estatística do trabalho e ter sido tão eficaz na execução da mesma, orientando, questionando e esclarecendo todo o processo.

Ao Prof. Dr. Sidnei Sakamoto, por aceitar fazer parte da banca examinadora e sempre contribuir com críticas construtivas.

A Dra. Larissa Demoner, por também aceitar fazer parte da banca e contribuir com a avaliação e melhoria do trabalho final.

A todos do HOVET que contribuíram direta e indiretamente para a execução desse projeto, incluindo residentes e técnicos. Especialmente o pessoal do setor de diagnóstico por imagem, nas pessoas de Sávio e Eduardo Baracho, e o pessoal do laboratório de patologia clínica, especificamente nas pessoas de Erinaldo, Vanusa e Ivana.

A todos os animais que participaram do experimento e dos quais escolhi cuidar para o resto da vida. Bem como aos seus tutores que me permitiram incluí-los no estudo.

Aos professores da Pós-graduação em Ciência Animal da UFRSA, que sempre se mostraram dispostos à ajudar e repassar seus conhecimentos sem escolher a quem.

A Bruna, Caroline, Aline e Naira, meninas que me acolheram e me abrigaram durante minha estadia em Botucatu-SP, me recebendo com alegria e ajudando em tudo que era possível.

A todos aqueles que numa certa parte da estrada a caminho dessa conquista me apoiaram, incentivaram, ajudaram e acreditaram em mim.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, por permitir e dar suporte para o crescimento científico dos alunos.

A CAPES pelo apoio financeiro durante o período do mestrado.

Minha eterna gratidão!

“A vida sem ciência é uma espécie de morte.”

Sócrates

PESQUISA DE AGENTES VIRAIS CAUSADORES DE ABORTAMENTO, NATIMORTALIDADE E MORTALIDADE NEONATAL EM GATAS

OLIVEIRA, Ilanna Vanessa Pristo de Medeiros. Pesquisa de agentes virais causadores de abortamento, natimortalidade e mortalidade neonatal em gatas. 2017. 43f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró-RN, 2017. (Dissertação)

RESUMO: Embora a infertilidade e a perda da prenhez em gatas sejam ainda pouco estudadas, sabe-se que as causas virais se destacam quando referente à esse contexto. Diante disso, este estudo objetivou identificar a prevalência de agentes virais desencadeadores de patologias reprodutivas que culminam com abortamento, natimortalidade e mortalidade neonatal em gatas atendidas no Hospital Veterinário da Universidade Federal Rural do Semi-Árido. Amostras de sangue de 26 fêmeas gestantes foram coletadas para realização de hemograma, bioquímicas renal e hepática e análise da glicemia. Além disso, exame de ultrassonografia foi realizado para avaliação da viabilidade fetal. Quando possível, coletaram-se placentas, humores e tecidos fetais. As amostras sanguíneas foram testadas através de qPCR e foram negativas para os vírus causadores de Leucemia felina (FeLV) e Imunodeficiência felina (FIV). Nos testes qPCR e PCR para presença do Alpha hespervírus felino tipo 1 (FHV-1), apenas uma amostra de sangue materno mostrou-se positiva. Tecidos dos fetos oriundos desta fêmea foram negativos para FHV-1. Todas as amostras maternas foram positivas para Parvovírus felino (FPV) ou canino (CPV) pelos teste qPCR e PCR. Os resultados de hemograma e bioquímica apresentaram significância nos achados de neutrofilia, linfopenia e monocitose, além de aumento discreto das bioquímicas referentes à fígado (ALT e AST). Associando esses achados aos resultados maternos positivos para o Parvovírus (PV) sugere-se este agente como causador dos abortamentos e natimortalidades nas gatas pesquisadas.

Palavras-chave: Perda de prenhez. *Felis catus*. Falhas reprodutivas. Causas infecciosas.

RESEARCH OF VIRAL AGENTS CAUSING OF ABORTMENT, NATIMORTALITY AND NEONATAL MORTALITY IN QUEENS

OLIVEIRA, Ilanna Vanessa Pristo de Medeiros. Research of viral agents causers of abortment, natimortality and neonatal mortality in cats. 2017. 43f. Dissertation (Master's degree in Animal Science) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró-RN, 2017. (Dissertation)

ABSTRACT: Although infertility and pregnancy loss in cats are still little studied, it is known that the viral causes stand out when referring to this context. Aiming at this, this study aimed to identify the prevalence of viral agents that trigger reproductive pathologies that culminate in abortion, stillbirth and neonatal mortality in cats treated at the Veterinary Hospital of the Federal Rural Semi-Arid University. Samples of blood from each mother (26 pregnant females) were collected for hemogram, renal and hepatic biochemistry and blood glucose analysis. Ultrasound examination was performed to evaluate fetal viability. When possible, placentas, humors and fetal tissues were collected. Blood samples were tested by qPCR and were negative for Feline Leukemia (FeLV) and Feline Immunodeficiency (FIV) viruses. In the test qPCR and PCR for the presence of the feline Alpha herpesvirus type 1 (FHV-1), only one sample of maternal blood was positive. Tissues from fetuses from this female were negative for FHV-1. All maternal samples were positive by qPCR and PCR for Feline parvovirus (FPV) or canine (CPV). The hemogram and biochemistry results were significant in the findings of neutrophilia, lymphopenia and monocytosis, in addition to the discrete increase in liver biochemistry (ALT and AST). Associating these findings with positive Parvovirus (PV) maternal results suggests this agent as the cause of the abortments and stillbirths in the studied cats.

Keywords: Loss of pregnancy. *Felis catus*. Reproductive failures. Infectious causes.

LISTA DE ABREVIATURAS

FeLV	Vírus da Leucemia Felina
FIV	Vírus da Imunodeficiência Felina
FHV-1	Hespesvírus Felino tipo 1
FPV	Parvovírus Felino
SNC	Sistema Nervoso Central
DNA	Ácido desoxirribonucleico
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
qPCR	Reação em Cadeia de Polimerase em tempo real
HÁ	Hemaglutinação
CPV	Parvovirus Canino
ELISA	Teste de imunoabsorção ligada à enzima
RF	Falha reprodutiva
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
RBC	Hemograma
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
OSH	Ovariosalpingohisterectomia
MCV	Volume corpuscular médio de hemácias
MHCH	Concentração de hemoglobina corpuscular média
PV	Parvovírus

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	16
2.	OBJETIVOS.....	21
2.1.	OBJETIVO GERAL.....	21
2.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
3.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	22
4.	ARTIGO CIENTÍFICO.....	25
	ANEXOS.....	41

1 INTRODUÇÃO

O período de gestação normal para gatas compreende 52 a 74 dias (LAMM; NJAA, 2012). A interrupção patológica ou perda da prenhez pode ocorrer devido a infecção, a defeitos fetais ou a desequilíbrios endócrinos maternos (ROMAGNOLI, 2003), estando entre as causas infecciosas: doenças virais, bacterianas, fúngicas e protozoárias (GIVENS; MARLEY, 2008).

O abortamento não é um evento incomum durante a gravidez felina. Embora existam outras causas, como uso de drogas, agentes tóxicos, traumas, torção uterina, problemas genéticos ou nutricionais, os agentes infecciosos desempenham um papel importante na determinação da morte do conceito (ROMAGNOLI, 2003) e, dentro da casuística nesta espécie, as doenças causadas pelos vírus assumem uma posição de destaque (GIVENS; MARLEY, 2008).

A infertilidade e perda da gravidez na gata são pouco estudadas (VERSTEGEN et al., 2008), porém, já se sabe que falhas reprodutivas causadas por agentes virais podem ocorrer por transmissão transplacentária do patógeno com infecção direta de embriões e fetos ou, menos frequentemente, pela debilitação grave de animais prenhes (DECARO et al., 2012). Diante disso, dentre as causas virais mais relatadas estão os vírus da: Leucemia Felina (FeLV), Imunodeficiência Felina (FIV), Herpesvirus Felino tipo 1 (FHV-1) e Panleucopenia Felina (FPV) (VERSTERGEN, 2008).

Assim, para promover uma investigação adequada de falhas reprodutivas nas quais há infertilidade envolvendo perda de gravidez, faz-se necessário a obtenção de histórico completo e exame clínico detalhado. Em seguida, exames complementares específicos são indicados para alcançar o diagnóstico adequado, mesmo porque a incompetência reprodutiva e a infertilidade são muitas vezes complexas e multifatoriais. Nessas situações, o primeiro objetivo é determinar a causa do problema (VERSTEGEN et al, 2008) pois, uma vez detectada, a intervenção clínica ideal poderá ser executada, o que terá como consequências o controle da causa bem como a tomada de decisões e atitudes referentes à epidemiologia e profilaxia da doença, o que evitará que a mesma se dissemine (LAMM; NJAA, 2012).

Um exame complementar bastante utilizado na rotina veterinária é o hemograma, pela sua praticidade, economia e utilidade na prática clínica. Apesar do mesmo raramente

explicitar a causa de determinada patologia ou doença, fornece informações que, em associação aos sinais clínicos e outros exames, apontam o direcionamento diagnóstico. Para tanto, o histórico e o exame clínico são essenciais na interpretação dos dados hematológicos e outros testes laboratoriais, como as bioquímicas, que serão objetos de investigação para estabelecimento de diagnóstico definitivo (LOPES et al., 2007). Ainda, nas doenças virais em questão, faz-se necessário a utilização de testes mais sensíveis e específicos, que são as técnicas moleculares para detecção de DNA (DECARO et al., 2010), como a Reação em Cadeia de polimerase (PCR).

A Leucemia felina é causada por um vírus membro do gênero *Gammaretrovirus*, que pertence à família Retroviridae (ICTV, 2015). A evolução da doença em gatos infectados é geralmente definida de acordo com a presença do provírus e antígenos virais no sangue, o que a torna altamente imprevisível porque é dependente de fatores como subtipo do vírus, idade e estado geral do gato infectado (BOENZLI et al., 2014). Todos os subtipos podem levar ao abortamento, infertilidade e reabsorção fetal e, na maioria das vezes, as gatas não apresentam sintomatologia antes de abortar (TROY; HERRON, 1986).

FeLV é disseminado em grandes quantidades pela saliva, que é a principal fonte de infecção. A transmissão vertical ocorre frequentemente através da via transplacentária. Gatas latentemente infectadas também podem transmitir o vírus a seus filhotes devido à reativação do mesmo durante a gestação (HARTMANN, 2006).

Em gatas virêmicas (ELISA direto positivo), o FeLV induz a perda da prenhez (GOLDSMITH, 1975). Um padrão de reabsorção fetal em gatas infectadas, com isolamento do vírus a partir dos fetos, neonatos, e do útero de gatas grávidas virêmicas, foi relatado. Embora se acredite que a perda da gravidez ocorra pela infecção fetal direta, também é sugerido que o vírus rompa o endométrio nos locais de fixação da placenta. Gatas não-virêmicas (ELISA negativo), que superaram a infecção inicial mas estão latentemente infectadas, podem se reproduzir normalmente e não apresentam risco de abortamento (LUTZ et al., 1983).

O diagnóstico da infecção por FeLV é feito através da detecção da presença ou não de uma proteína (p27), que se torna abundante no citoplasma de células infectadas e, na sua forma livre, pode ser encontrada na saliva e nas lágrimas do animal (HARTMANN, 2012). O teste rotineiramente utilizado para detectar tal proteína é o ELISA (imunocromatografia), o qual também é útil para diagnosticar as formas clínicas da FeLV. Porém, o ELISA não é

capaz de detectar infecções latentes devido à falta de p27 livre nas células do sangue nesse tipo de infecção (LUTZ et al., 1980). Ainda, as formas clínicas induzidas pela replicação viral afetam tecidos específicos, como medula óssea, glândulas mamárias e SNC, e não possibilitam diagnóstico através de métodos de detecção de antígeno. Com isso, o método capaz de detectar animais acometidos pela infecção latente é a qPCR, por meio da detecção de DNA próviral presente na saliva ou outros fluidos biológicos (LUTZ et al., 2009).

O vírus da imunodeficiência felina (FIV) é um retrovírus membro do gênero *Lentivirus* (ICTV, 2015) que afeta os membros da família Felidae (LITSTER, 2014). A transmissão do FIV para gatos saudáveis ocorre principalmente através de mordidas, por transmissão vertical ou pediátrica (ou seja, de neonato para neonato) (MESQUITA et al., 2014).

A transmissão vertical pode ocorrer no útero, por via transplacentária, resultando em abortamentos, natimortalidades, pausa ou retardo do desenvolvimento fetal, ou podendo levar ao nascimento de animais viáveis infectados com o vírus (WEAVER et al., 2005), podendo ainda acontecer durante o parto, através do contato direto com as secreções genitais (HARTMANN, 2011). Inoculação experimental com FIV em gatas livres de agentes patogênicos resultou em 60% de fetos reabsorvidos ou apresentando desenvolvimento fetal retardado (WEAVER et al., 2005).

O diagnóstico da FIV é realizado por meio do ELISA, com base na detecção de anticorpos contra as proteínas estruturais (p24). Os filhotes nascidos de gatas infectadas com FIV podem testar falso-positivos e devem ser testados novamente com 16 semanas de idade. Os resultados falso-negativos, por sua vez, podem estar relacionados com a falta de soroconversão na fase inicial da infecção e com a imunodeficiência induzida na fase tardia de infecção. Nesses casos, os métodos diretos, tal como PCR e qPCR, podem ser utilizados para detectar o DNA próviral em leucócitos circulantes (DECARO et al., 2012).

O Herpesvírus Felino tipo 1 (FHV-1) é um alfa herpesvírus que afeta gatos domésticos e vários outros membros da família Felidae, causando a rinotraqueíte (HICKMAN et al., 1994; SMITH, 1997). Tal vírus compartilha semelhanças com o Herpesvírus Canino (HICKMAN et al., 1994) e, como em cães, muitos gatos que se recuperam da infecção aguda por FHV-1 se tornam portadores virais latentes persistentes, possibilitando a reativação espontânea ou induzida por diferentes fatores estressores (doença, cirurgia, gravidez, lactação, tratamento com corticosteróides) (VERSTEGEN et al, 2008). Esse vírus é eliminado principalmente através de secreções oculares, nasais e bucais, e é transmitido

por contato direto de um animal infectado (seja em fase aguda ou em fase assintomática) com um susceptível ou mesmo por contato indireto em locais com aglomeração (DECARO et al., 2012).

A infecção experimental pelo FHV-1 causou abortamento e mortalidade fetal intra-uterina (JOHNSTON et al, 2001). Entretanto, o vírus não foi isolado do tecido fetal abortado (SMITH, 1997). Parece causar abortamento devido ao efeito debilitante da infecção respiratória superior em gatas, e pode infectar os animais durante o período neonatal. A transmissão *in utero* da doença não foi demonstrada, exceto em determinadas condições experimentais (VERSTEGEN et al., 2008).

Referente ao FHV-1, o teste de PCR tem, na teoria, especificidade e sensibilidade altas, de modo que vários protocolos de PCR já foram desenvolvidos para o diagnóstico do FHV-1 (GOULD, 2011). O DNA viral do Herpesvírus pode ser encontrado por meio de ensaios de PCR por longos períodos (POWELL; LAPIN, 2001a; POWELL; LAPIN, 2001b; MAGGS et al., 1999), o que pode comprovar a presença do DNA desse vírus no sangue de gatos com e sem sinais clínicos (POWELL et al, 2010).

O vírus da panleucopenia felina (FPV) é membro do gênero *Parvovirus* e pertencente à família Parvoviridae (ICTV, 2015). Pode infectar o útero e, quando isso ocorre no início da gestação, é capaz de causar mortalidade e reabsorção fetais, abortamento e fetos mumificados. Caso a infecção ocorra no terço final da gravidez, o vírus tem a capacidade de lesionar o tecido neuronal dos fetos (STUETZER; HARTMANN, 2014), podendo afetar cérebro, cerebelo, retina e nervo óptico (AEFFNER et al., 2006). O FPV é transmitido por via oro-fecal, o que acontece principalmente através do contato com fluidos corporais infectados, fezes ou outros fômites, bem como por pulgas (STUETZER; HARTMANN, 2014).

Como método de diagnóstico do FPV, utiliza-se imunocromatografia, hemaglutinação (HA) e PCR, mas nenhum dos testes é capaz de diferenciar a cepa do Parvovirus em questão (se felina – FPV – ou canina – CPV) (DECARO et al., 2012). Comumente, quando o foco são as patologias reprodutivas ocasionadas pelos vírus, o diagnóstico é feito através do isolamento do agente a partir de fetos ou recém-nascidos submetidos à necropsia, soroconversão na mãe, ou clinicamente, nos casos de infecção pelo PV, pela ataxia característica observada nos recém-nascidos (PRESCOTT, 1972). Ainda, o DNA FPV tem

sido detectado através de PCR no tecido do cerebelo de gatos acometidos (RESIBOIS et al., 2007).

Diante disso, no presente trabalho, foi utilizado um questionário baseado em Lamm e Njaa (2012) (ANEXO A), aplicado pelo pesquisador após a assinatura do termo de consentimento efetuada pelo tutor do animal (ANEXO B), como meio de obtenção de história clínica detalhada, além de um *check list* (ANEXO C) também baseado nos referidos autores.

Portanto, com o intuito de identificar a causa e na tentativa de estabelecer controle epidemiológico e medidas profiláticas adequadas, o presente trabalho objetivou identificar a prevalência dos vírus que mais comumente acometem felinos domésticos (FeLV, FIV, FHV-1 e FPV), por meio da qPCR e PCR, em gatas com histórico de dificuldade durante o parto, abortamento, natimortalidade e mortalidade neonatal e dos seus fetos, atendidas no Hospital Veterinário Jerônimo Dix-Huit Rosado – HOVET, da Universidade Federal Rural do Semi-Árido - UFERSA, Mossoró/RN.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estabelecer a prevalência dos vírus que mais comumente acometem felinos domésticos (FeLV, FIV, FHV-1 e FPV) em gatas com histórico de dificuldade durante o parto, abortamento, natimortalidade e mortalidade neonatal e dos seus fetos, atendidas no HOVET da UFERSA.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Correlacionar os achados da qPCR e PCR com inviabilidade fetal;
- Correlacionar possíveis alterações encontradas no hemograma e nos exames bioquímicos com os achados clínicos.

REFERÊNCIAS

- AEFFNER, F. et al. Cerebellar hypoplasia in three sibling cats after intrauterine or early postnatal parvovirus infection. **Deutsche Tierärztliche Wochenschrift**, v. 113, n. 11, p.401-406, 2006.
- BOENZLI, E. et al. Detection of Antibodies to the Feline Leukemia Virus (FeLV) Transmembrane Protein p15E: an Alternative Approach for Serological FeLV Detection Based on Antibodies to p15E. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 6, p. 2046–2052, 2014.
- DECARO, et al. Characterisation of canine parvovirus strains isolated from cats with feline panleukopenia. **Research in Veterinary Science**, v. 89, n. 2, p.275–278, 2010.
- DECARO, N.; CARMICHAEL, L. E.; BUONAVOGLIA, C. Viral Reproductive Pathogens of Dogs and Cats. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 42, n. 3, p.583-598, 2012.
- GIVENS, M. D.; MARLEY, M. S. D. Infectious causes of embryonic and fetal mortality. **Theriogenology**, v. 70, n. 3, p.270-285, 2008.
- GOLDSMITH, F. G. Habitual abortion and FeLV. **Feline Practice**, v. 5, n. 4, 1975.
- GOULD, D. Feline herpesvirus-1: ocular manifestations, diagnosis and treatment options. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 13, p.333-346, 2011.
- HARTMANN, K. Feline leukemia virus infection. In: GREENE, C. E. (Org.). **Infectious diseases of the dog and cat**. 3. ed. St Louis: Saunders Elsevier, 2006. p. 105–131.
- HARTMANN, K. Clinical aspects of feline immunodeficiency and feline leukemia virus infection. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 143, n. 3-4, p.190-191, 2011.
- HARTMANN, K. Feline leukemia virus infection. In: GREENE, C. E. (Org.). **Infectious diseases of the dog and cat**. 4. ed. St Louis: Saunders Elsevier, 2012. p.108-136.
- HICKMAN, M. A. et al. An epizootic of feline herpesvirus, type 1 in a large specific pathogen-free cat colony and attempts to eradicate the infection by identification and culling of carriers. **Laboratory Animals**, v. 28, n. 4, p.320-329, 1994.
- INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES. **Virus Taxonomy**. London: 2015. Disponível em: <<https://talk.ictvonline.org/>>. Acesso em: 05 mar. 2017.
- JOHNSTON, S. D.; KUSTRITZ, M. V. R.; OLSON, P. N. S. **Canine pregnancy**. In: KERSEY, R (Org.). **Canine and feline theriogenology**. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 2001. p.66–104.

- LAMM, C. G.; NJAA, B. L. Clinical Approach to Abortion, Stillbirth, and Neonatal Death in Dogs and Cats. **Veterinary Clinics Of North America: Small Animal Practice**, v. 42, n. 3, p.501-513, 2012.
- LITSTER, A. L. Transmission of feline immunodeficiency virus (FIV) among cohabiting cats in two cat rescue shelters. **Veterinary Journal**, v. 201, n. 2, p.184-188, 2014.
- LOPES, S. T. A.; BIONDO, A. W.; SANTOS, A. P.; **Manual de Patologia Clínica Veterinária**. Departamento de Clínica de Pequenos Animais. Universidade Federal de Santa Maria – UFSM, 3. ed. Santa Maria, 2007.
- LUTZ, H. et al. Humoral immune reactivity to feline leukemia virus and associated antigens in cats naturally infected with feline leukemia virus. **Cancer Research**, v. 40, n. 10, p.3642–3651, 1980.
- LUTZ, H.; PEDERSEN, N. C.; THEILEN, G. H. Course of feline leucemia virus infection and its detection by enzyme-linked immunosorbent assay and monoclonal antibodies. **American Journal of Veterinary Research**, v. 44, n. 11, p.2054–2059, 1983.
- LUTZ, H. et al. Feline leukaemia. ABCD guidelines on prevention and management. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 11, n. 7, p.565–574, 2009.
- MAGGS, D. J. et al. Evaluation of serologic and viral detection methods for diagnosing feline herpes-virus-1 infection in cats with acute respiratory tract or chronic ocular disease. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 214, n. 4, p.502–507, 1999.
- MESQUITA, L. P. et al. Aspectos histopatológicos das lesões renais em gatos experimentalmente infectados pelo vírus da imunodeficiência felina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 9, p.869-873, 2014.
- POWELL, C. C. et al. Bartonella species, feline herpesvirus-1, and Toxoplasma gondii PCR assay results from blood and aqueous humor samples from 104 cats with naturally occurring endogenous uveitis. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 12, n. 12, p.923-928, 2010.
- POWELL, C. C.; LAPPIN, M. R. Causes of feline uveitis. **Compendium on Continuing Education for the Practising Veterinarian**, v. 23, n. 2, p.128-141, 2001a.
- POWELL, C. C.; LAPPIN, M. R. Diagnosis and treatment of feline uveitis. **Compendium on Continuing Education for the Practising Veterinarian**, v. 23, n. 2, p.258-266, 2001b.
- PRESCOTT, C. W. Neonatal diseases in dogs and cats. **Australian Veterinary Journal**, v. 48, n. 11, p.611–618, 1972.
- RESIBOIS, A.; COPPENS, A.; PONCELET, L. Naturally occurring parvovirus-associated feline hypogranular cerebellar hypoplasia– A comparison to experimentally induced lesions using immunohistology. **Veterinary Pathology**, v. 44, n. 6, p.831–841, 2007.

ROMAGNOLI, S. Clinical approach to infertility in the queen. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 5, n. 2, p.143–146, 2003.

SMITH, K. C. Herpesviral abortion in domestic animals. **Veterinary Journal**, v. 153, n. 3, p.253–268, 1997.

STUETZER, B.; HARTMANN, K. Feline parvovirus infection and associated diseases. **Veterinary Journal**, v. 201, n. 2, p.150–155, 2014.

TROY, G. C.; HERRON, M. A. Infectious causes of infertility, abortion and stillbirths in cats. In: MORROW, D.A. (Org.). **Current therapy in theriogenology**. 2. ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1986. p.834–837.

VERSTEGEN, J.; DHALIWAL, G.; VERSTEGEN-ONCLIN, K. Canine and feline pregnancy loss due to viral and non-infectious causes: A review. **Theriogenology**, v. 70, n. 3, p.304–319, 2008.

WEAVER, C. C. et al. Placental immunopathology and pregnancy failure in the FIV-infected cat. **Placenta**, v. 26, n. 2-3, p.138–147, 2005.

3 ARTIGO CIENTÍFICO

Survey viral causes of abortment, natimortality and neonatal mortality in queens with reproductive failures

Ilanna Vanessa Prito de Medeiros Oliveira^a, Débora Alves de Carvalho Freire^a, Heider Irinaldo Pereira Ferreira^a, Gabriela Hemylin Ferreira Moura^a, Célio Souza da Rocha^a, Cecilia Irene Pérez Calabuig^a, Jacqueline Kazue Kurissio^b, João Pessoa Araujo Junior^b, João Marcelo Azevedo de Paula Antunes^{a*}

^aHospital Veterinário Jerônimo Dix-Huit Rosado, Departamento de Ciência Animal, Univ Federal Rural do Semi-Árido – Ufersa/RN, Brazil.

^bIBTEC, Instituto de Biotecnologia, UNESP – Univ Estadual Paulista, Botucatu/SP, Brazil.

*Corresponding author: joao.antunes@ufersa.edu.br

Abstract

Although reproductive failures in cats are still under studied, it is known that the viral causes stand out in this context. Aiming at this, this survey aimed to identify the prevalence of viral agents that cause abortment and stillbirth in cats. The queens were only included in the study if they have no genetic, traumatic, hormonal or nutritional problems or history of problems in previous or current pregnancies. Samples of blood of mothers (26 pregnant females) were collected for hemogram, renal and hepatic biochemistry and glycemic analysis. Ultrasonography was performed to evaluate fetal viability. When possible, placentas, humors and fetal tissues were collected. Blood samples were tested by PCR for FIV, FeLV and PCR and qPCR for FHV-1, FPV and CPV. For FeLV and FIV gave negative. For FHV-1, only one sample of blood was positive. Tissues from the fetuses from this female were negative for FHV-1. All maternal samples were positive for Parvovirus. The hemogram and biochemistry results were significant in the findings of neutrophilia, lymphopenia and monocytosis, in addition to the discrete increase in liver biochemistry (ALT and AST). Associating these findings with positive Parvovirus (PV) maternal results suggests this agent as the cause of the abortments and stillbirths in the studied cats.

Keywords: Loss of pregnancy, *Felis catus*, reproductive failures, infectious causes.

Introduction

The normal gestation period for cats comprises 52 to 74 days (Lamm and Njaa, 2012). Pathological interruption or loss of gestation may occur due to infection, fetal defects or maternal endocrine imbalances. Abortion is not an uncommon event during feline pregnancy and infectious agents play an important role in determining the death of the concept (Romagnoli, 2003).

Infertility and pregnancy loss in the cat are little studied (Verstegen et al., 2008), however, it is known that viruses are a major cause of reproductive failure (RF) in this species. In these cases, RF may be caused by transplacental transmission that directly infects the embryos and fetuses or, less frequently, by severe debilitation of pregnant animals, in the absence of congenital infection (Decaro et al., 2012). Among the most commonly reported viral causes are Feline Leukemia (FeLV), Feline Immunodeficiency Virus (FIV), Feline Herpesvirus type 1 (FHV-1) and Feline Panleukopenia virus (FPV) (Verstegen et al., 2008).

Four FeLV subtypes are known and all of them cause can abortion, infertility and fetal resorption. Usually, cats do not present symptoms prior to abortion (Troy and Herron, 1986). In viraemic queens (positive ELISA), FeLV induces loss of pregnancy (Goldsmith, 1975) and a pattern of fetal resorption has been reported in infected cats (Verstegen et al., 2008).

FIV can be transmitted in utero, resulting in miscarriages, stillbirths, pauses or retarded fetal development, or may lead to the birth of viable kittens infected with the virus. Experimental inoculation with FIV in free-of-pathogen cats resulted in 60% of fetuses being reabsorbed or exhibiting delayed fetal development (Weaver et al., 2005).

FPV can infect the uterus and, when this occurs early in pregnancy, can cause fetal mortality, reabsorption, abortion, and mummified fetuses. If the infection occurs in the final third of pregnancy, the virus can cause damage to the fetal neural tissue (Stuetzer and Hartmann, 2014).

Experimental infection with the FHV-1 caused abortion and intrauterine fetal death (Johnston et al., 2001). However, the virus was not isolated from aborted fetal tissue (Smith, 1997). This pathogen appears to cause miscarriage due to the debilitating effect of upper respiratory infection on cats, and also infects kittens during the neonatal period (Verstegen et al., 2008).

This study aimed to identify the prevalence of viruses that most commonly affect domestic felines (FeLV, FIV, FHV-1 and FPV) in cats with a history of difficulty during parturition, abortion, stillbirth, and neonatal and fetal mortality.

Methodology

The study was conducted according to the Committee on Ethics in Animal Use (CEUA) - UFERSA (n° 23091.006795 / 2015 - 88). The animals were included in the work after the tutors signed a consent form and answered a questionnaire (adapted from Lamm and Njaa, 2012). The female cats were inserted in the survey, if they did not present reports of genetic, traumatic, hormonal or nutritional problems nor a history of problems in previous or present pregnancies. A total of 42 samples were collected from queens (26 with RF and 16 without RF - females of childbearing age who went to the hospital due to non-reproductive causes) attended at the Veterinary Hospital Jerônimo Dix-Huit Rosado - HOVET at the Federal Rural Semi-Arid University in Mossoro / RN, Brazil.

Blood of queens with and without RF was collected by venipuncture of the jugular vein in two vacuum containment tubes, with and without EDTA. A complete blood count, measurement of biochemistry related to kidneys and liver, as well as the measurement of serum glucose were performed. The animals were considered to have infectious leukogram when the white blood cell count was outside the reference values (reference 7-23mil / mm³) and anemia when RBC values (5-10million / mm³), hemoglobin (8-15g%) and hematocrit (24-45%) were below reference. It was possible to present change in blood glucose when the values of glucose were below or above the reference (70-110 mg / dL), the presence of renal disease when the biochemical values of urea and creatinine were above the reference (43-64 mg / dL and 0.7-1.7 mg / dL, respectively) and the presence of liver disease when the values of the biochemical ALT (Alanine aminotransferase) and AST (aspartate aminotransferase) were above the reference (10-50 U / L and 10-40 U / L, respectively). The reference values are presented in table 1 (Jain, 1993; Kaneko, 1997; Meyer and Harvey, 2004).

Samples of the 26 queens with RF were collected in the operating room after they were submitted to ovarosalphingohysterectomy (OSH) or cesarean section. Macroscopic examinations of the uterus, placenta and fetus were performed and photodocumented. From the queens, we collected blood to obtain serum and stored whole blood and uterus. Of the fetuses, all tissues from the organs were collected, depending on the condition of the material (mummified,

macerated or not). All samples were stored in a freezer at -20° C until complete extraction of DNA.

DNA extraction from maternal blood samples was performed with the Illustra™ (Blood GenomicPrep Mini Spin - GE HealthCare) kit following the manufacturer's recommendations. For the extraction of genetic material from the tissues the GeneJet Genomic DNA Purification kit (Thermo Scientific) was used.

Molecular tests

qPCR and PCR tests followed by electrophoresis on agarose gel were performed in queens with RF. If samples of maternal blood were positive for some pathogen that the foetal tissues were tested. For the detection of FHV-1, FIV, CPV, FPV and FeLV, the tests was performed using DNA extracted from the blood of the mothers (Vögtlin et al., 2002; Taniwak et al., 2011; Decaro et al., 2008; Tandon et al., 2005).

Statistical analysis

The chi-square test was performed through cross-tabulations (non-parametric data) to verify the dependence of the variable "animals with abortion and foetal death" in relation to other noninfectious variables Obtained through the application of the questionnaire: primiparous or multiparous, size of litter and number of neonates, presence of contacts who have already presented RF, existence sick contacts, contraceptive use, genetic test, presence of ectoparasites, introduction of new animals or arrival of animals that have traveled, vaccination and nutritional status. For that, the statistical program SPSS version 22 was used.

An analysis of variance (ANOVA) between healthy animals (16 queens) and animals that presented RF (26 queens) during the pregnancy was performed in order to determine whether the groups differed in any of the parameters. A table containing the haematological data of the animals with reproductive problems and a new group of healthy animals that came to the UFERSA HOVET was constructed. The variables used were: red blood cells (RBC), haemoglobin, haematocrit, medium hemacy corpuscular volume (MCV), concentration of mean corpuscular haemoglobin (MCHC), leukocytes, segmented neutrophils, rods, eosinophils, lymphocytes, monocytes, platelets, ALT, AST, urea, creatinine, total protein, albumin, globulin and albumin / globulin ratio.

Results

The possible non-infectious causes (primiparous or multiparous, use of contraceptives, age, contacts, presence of ectoparasites, update of vaccines and nutritional status of the animal) were considered as part of the evaluation of the results but did not present statistical significance. By the macroscopic analyses, the occurrence of organs with hemorrhagic aspects and changes indicative of the mummification process were observed.

The whole blood of the 26 females of the study was submitted to the qPCR technique to confirm diagnosis of FIV and FeLV and all presented negativity (Table 2). In the test for FHV-1 only the F5 mother was positive. Therefore, the kidneys and placenta pools of the fetuses from this mother were submitted to the same test in which presented negativity. The whole blood of the F5 female was submitted to PCR followed by electrophoresis to confirm the presence of the FHV-1, which was conclusive for positivity. Then the same whole blood samples were tested by qPCR and PCR for FPV and canine Parvovirus (CPV), so that all of them were positive (Table 2). We proceeded to perform qPCR to verify FPV and CPV in spleen/kidneys pools of the fetuses. Only the F29 fetuses showed positivity.

Statistical analysis of the hematological data revealed a significance ($p < 0.05$) for the biochemistry used for liver evaluation (ALT and AST). Of the 26 females tested, 18 presented alterations in these enzymes, which also were directly related to the analysis of fetal viability. In addition, 19 of these 42 females showed significant changes ($p < 0.05$) in the relative counts of segmented neutrophils, 22 had significant alterations ($p < 0.05$) in lymphocyte counts, both relative and absolute, 18 of them presented values which showed a significant alteration ($p < 0.05$) in absolute monocyte counts (Table 3).

Discussion

Only one female from this study tested positive for the FHV-1. The tissues collected from the fetuses of this queen were also tested, but presented negativity. This result corroborates with Verstegen et al. (2008), who attributed an occurrence of abortion when infected with FHV-1 to the systemic state of the mother and not the direct action of the virus on fetuses, a fact reported by Johnston et al. (2001). Moreover, Smith (1997) reported that in abortions that have caused by FHV-1, the virus has not been found in foetal tissues.

The qPCR and PCR were used as standard tests in this study, especially related to FPV and CPV. For laboratory diagnosis, ELISA and haemagglutination (HA) tests, aiming to investigate the presence of Parvovirus (PV) are widely used, but both do not present adequate

sensitivity (Mochizuki et al., 1993; Uwatoko et al., 1995). It is also possible to use the viral isolation method, a technique that requires a lot of time (approximately 3 days) and may present errors in the interpretation of the results (Decaro et al., 2005). Thus, PCR protocols for PV detection were developed (Buonavoglia et al., 2001; Schunck et al., 1995), allowing the use of this molecular tool as a standard test, which has a very expressive sensitivity and specificity to the virus in question (Decaro et al., 2005).

The genetic material used to perform qPCR and PCR to identify the presence or absence of PV included feline and canine strains. In fact, these viruses are a mutation of each other, which confers genetic and antigenic similarities (Berns et al., 2000), which leads them to be considered as a single taxonomic unit (Tattersall, 2006). It is known that CPV can infect felines (Decaro et al., 2012) and establish the infection, which may result in the development of clinical symptoms related to Feline Panleucopenia (Battilani et al., 2006) or absence of any symptoms, which means that these infected cats continue to be considered healthy (Mochizuki et al., 1993). However, when there are clinical manifestations, it is impossible to distinguish the viral strain only by the differentiation of the symptoms (Mochizuki et al., 1993, Nakamura et al., 2001, Gamoh et al., 2003).

In this study, the RF of abortment and natimortality were found and there were fetuses present in the mummification process in uterus (Table 2). The action of the FPV in the female reproductive system can lead to the development of several pathologies (Troy and Herron, 1986). The determination of the reproductive consequence inherent to the establishment of the infection in utero of pregnant females is the period of gestation, in which there will be the infection (August, 1989). Abortion, mummification of fetuses and stillbirth are commonly associated to infections that occur in the early thirds of pregnancy (Lamm and Rezabeck, 2008). We found 11 animals that showed those pathological abnormalities, which suggest that queens were infected in the early thirds of pregnancy. Fetuses showing brain damage/foetal malformation indicate that the female was infected in the final third of gestation (Stuetzer and Hartmann, 2014). In the present study, 4 female cats had fetuses with these malformations, suggesting infection in that period of gestation.

The cats of the present study did not present clinical symptoms that indicated suspicion of PV infection. According to the literature, the development of clinical symptomatology depends on a satisfactory immune response, age and occurrence of possible secondary

infections (Foley et al., 1999). However, when the infected feline is pregnant, the abortion is the only symptom that it may happen (Decaro et al., 2012).

Because the blood of the mothers was positive for the PV, some foetal tissues were tested for the same virus, with negative results. However, with the PCR assay, a fetal tissue sample (fetal spleen assembly of F29) was positive. This is explained when Givens and Marley (2008) state that animals that develop pregnancies with multiple fetuses and are affected by some infection that can cause fetal contamination, the level of fetal infection and its consequences will differ individually.

The alterations found in the complementary tests performed with the blood samples collected from the mothers showed statistical significance (relative neutrophilia, lymphopenia and monocytosis) with fetal unfeasibility. The presence of neutrophilia in white cell counts (WBC) can occur in the late stages of FPV infection in cats (August, 1989). Lymphopenia is associated to the occurrence of panleucopenia, which is a common finding of FPV infection (Parrish, 1995). In relation to monocytosis, it can occur in acute or chronic stages of diseases (Lopes et al, 2007), it may happened in the infections described in our study.

Also, with reference to clinical pathology, the findings related to ALT and AST biochemistry, when compared to the foetal unviability, presented statistical significance. It was probably due to the fact that biochemical exams of non infected animals did not show specific alterations, with a slight increase in AST and ALT being more commonly found in infected animals (Greene, 2012).

Conclusion

Among the viral agents commonly reported as cause of RF's in female domestic felines, especially during pregnancy are: FIV, FeLV, FHV-1 and FPV. FHV-1 and PV were found in the present study, with higher prevalence of PV. This allows us to exclude the occurrence of the reproductive pathologies in question caused by FIV and FeLV. Our findings suggest that PV is the major cause of the reproductive pathologies in question, because there are reports of RF when the animal is infected with this virus, giving us scientific support. We did not find reports in the literature that proved CPV as a cause of reproductive pathologies in queens. Moreover, the results allow us to hypothesize that the FPV is the cause of the RF reported here. However, other infectious agents cannot be excluded as causing the RF, and further studies are

needed to assist in the elaboration of protocols for the treatment and prophylaxis of affected and susceptible animals, aiming maximum reduction of these cases.

References

AUGUST, J.R. Feline viral diseases. In: ETTINGER, S.J. (Ed). Textbook of veterinary medicine. Philadelphia: WB Saunders, 1989. p.314–317.

BATTILANI, M.; SCAGLIARINI, A.; CIULLI, S. et al. High genetic diversity of the VP2 gene of a canine parvovirus strain detected in a domestic cat. *Viol.*, n. 352, p.22–26, 2006.

BERNS, K.I.; BERGOIN, M.; BLOOM, M. et al. Family Parvoviridae. In: van REGENMORTEL, M.H.V.; FAUQUET, C.M.; BISHOP, D.H.L. et al. (Eds.), Virus Taxonomy, Classification and Nomenclature of Viruses. New York: Academic Press, 2000. p.311–323.

BUONAVOGLIA, C.; MARTELLA, V.; PRATELLI, A. et al. Evidence for evolution of canine parvovirus type 2 in Italy. *J. Gen. Virol.*, n. 82, p.3021–3025, 2001.

DECARO, N.; ELIA, G.; MARTELLA, V. et al. A real-time PCR assay for rapid detection and quantitation of canine parvovirus type 2 in the feces of dogs. *Vet Microbiol.*, n. 105, p.19–28, 2005.

DECARO, N.; DESARIO, C.; MICCOLUPO, A. et al. Genetic analysis of feline panleukopenia viruses from cats with gastroenteritis. *J Gen Virol*, n. 89, p.2290–2298, 2008.

DECARO, N.; CARMICHAEL, L.E.; BUONAVOGLIA, C. Viral Reproductive Pathogens of Dogs and Cats. *Vet Clin N Ame Sma Ani Prac*, n. 42, p.583-598, 2012.

FOLEY, J.E.; ORGAD, U.; HIRSH, D.C. et al. Outbreak of fatal salmonellosis in cats following use of a high-titer modified-live panleukopenia virus vaccine. *J Ame Vet Med Associa*, n. 214, p.67–70, 1999.

GAMOH, K.; SHIMAZAKI, Y.; MAKIE, H. et al. The pathogenicity of canine parvovirus type-2b, FP84 strain isolated from a domestic cat, in domestic cats. *J Vet Med Sci*, n. 65, p.1027–1029, 2003.

GIVENS, M. D.; MARLEY, M. S. D. Infectious causes of embryonic and fetal mortality. *Theriog*, v. 70, n. 3, p.270-285, 2008.

GOLDSMITH, F.G. Habitual abortion and FeLV. *Fel Prac*, n. 5, 1975.

GREENE, C.E. (Ed). Infectious Diseases of the dog and the cat. Georgia: Elsevier Saunders, 2012. 1354p.

JAIN, C.N. Essential of Veterinary Haematology. Philadelphia: Lea & Febiger. 1993. 417p.

JOHNSTON, S.D.; KUSTRITZ, M.V.R.; OLSON, P.N.S. Canine pregnancy. In: KERSEY, R. (Ed). Canine and feline theriogenology. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 2001. p.66–104.

KANEKO, J.J. Biochemistry of Domestic Animals. 5ed. New York: Academic Press. 1997. 932p.

LAMM, C. G.; NJAA, B. L. Clinical Approach to Abortion, Stillbirth, and Neonatal Death in Dogs and Cats. *Vet Clin N Ame Sm Ani Pract*, n. 42, p.501-513, 2012.

LAMM, C.G.; REZABEK G.B. Parvovirus Infection in Domestic Companion Animals. *Vet Clin N Ame Sm Ani Pract*, n. 38, p.837–850, 2008.

LOPES, S.T.A.; BIONDO, A.W.; SANTOS, A.P. (Eds). Manual de Patologia Clínica Veterinária. Departamento de Clínica de Pequenos Animais. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria – UFSM, 2007. 107p.

MEYER, D.J.; HARVEY, J.W. Veterinary Laboratory Medicine: Interpretation and Diagnosis. 3rd ed. St. Louis, MO: Saunders; 2004. 368p.

MOCHIZUKI, M.; HARASAWA, R.; NAKATANI, H. Antigenic and genomic variabilities among recently prevalent parvoviruses of canine and feline origin in Japan. *Vet. Microbiol.*, n. 38, p.1–10, 1993.

NAKAMURA, K.; SAKAMOTO, M.; IKEDA, Y. et al. Pathogenic potential of canine parvovirus types 2a and 2c in domestic cats. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, n. 8, p.663–668, 2001.

PARRISH, C.R. Pathogenesis of feline panleukopenia virus and canine parvovirus. *Baillieres Clin Haematol*, n. 8, p.57-71, 1995.

ROMAGNOLI, S. Clinical approach to infertility in the queen. *J Fel Med Surg*, n. 5, p.143–146, 2003.

SCHUNCK, B.; KRAFT, W.; TRUYEN, U. A simple touch-down polymerase chain reaction for the detection of canine parvovirus and feline panleukopenia virus in feces. *J Virol Met*, n. 55, p.427–433, 1995.

SMITH, K.C. Herpesviral abortion in domestic animals. *Vet J*, n. 153, p.253–268, 1997.

STUETZER, B.; HARTMANN, K. Feline parvovirus infection and associated diseases. *Vet J*, n. 201, p.150–155, 2014.

TANDON, R.; CATTORI, V.; GOMES-KELLER, M.A. et al. Quantitation of feline leukaemia virus viral and proviral loads by TaqMan® real-time polymerase chain reaction. *J Virol Met*, n. 40, p.124–132, 2005.

TANIWAKI, S.A. Serological or molecular diagnosis of FIV infection: advantages and disadvantages. *J Braz Soc Virol - Annals of XXII National Meeting of Virology & VI Mercosur Meeting of Virology*, v.16, p.32–33, 2011.

TATTERSALL, P. The evolution of parvovirus taxonomy. In: KERR, J.; COTMORE, S.F.; BLOOM, M.E. et al. (Eds). Parvoviruses. New York: Oxford University Press, 2006. p.5–14.

TROY, G.C.; HERRON, M.A. Infectious causes of infertility, abortion and stillbirths in cats. In: MORROW, D.A. (Ed). Current therapy in theriogenology. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1986. p.834–837.

UWATOKO, K.; SUNAIRI, M.; NAKAJIMA, M. et al. Rapid method utilizing the polymerase chain reaction for detection of canine parvovirus in feces of diarrheic dogs. *Vet. Microbiol.*, n. 43, p.315–323, 1995.

VERSTEGEN, J.; DHALIWAL, G.; VERSTEGEN-ONCLIN, K. Canine and feline pregnancy loss due to viral and non-infectious causes: A review. *Theriogen*, n. 70, p.304-319, 2008.

VÖGTLIN, A.; FRAEFEL, C.; ALBINI, S. et al. Quantification of Feline Herpesvirus 1 DNA in Ocular Fluid Samples of Clinically Diseased Cats by Real-Time TaqMan PCR. *J Clin Microbio*, n. 40, p.519–523, 2002.

WEAVER, C.C.; BURGESS, S.C.; NELSON, P.D. et al. Placental immunopathology and pregnancy failure in the FIV-infected cat. *Plac*, n. 26, p.138–147, 2005.

Table 1. Reference values for hemogram and biochemistry according Jain, 1993; Kaneko, 1997 and Meyer and Harvey, 2004

Analyzed parameter	Minimum value		Maximum value	Unit of measurement
RBC - Red blood cells	5,0		8,0	Millions/mm ³
HGB - Hemoglobin	9		15	g%
PCV - Hematocrit	24		45	%
MCV – Mean Corpuscular volume	38		52	u ³
MCHC – Mean Corpuscular Hemoglobin content	35		48	%
WBC – White blood cells	8000		25000	/mm ³
Segmented Neutrophils	Relative	35	75	-
	Absolute	3600	13800	
Bands	Relative	0	3	-
	Absolute	0	700	
Eosinophils	Relative	2	12	-
	Absolute	160	3000	
Basophils	Relative	0	1	-
	Absolute	0	0	
Lymphocytes	Relative	20	55	-
	Absolute	1600	13700	
Monocytes	Relative	1	4	-
	Absolute	80	1000	
Platelet	200000		600000	/mm ³
Glucose	70		110	mg/dL
Urea	21		54	mg/dL
Creatinine	0,7		1,7	mg/dL
ALT	10		50	u/L
AST	10		40	u/L

ALT=alanine aminotransferase; AST=aspartate aminotransferase.

Table 2. Results of exam *post mortem* and molecular tests for the queens with reproductive failures

Queens	Exam macroscopic of Uterus	Exam macroscopic of Placenta	Exam <i>post mortem</i> of fetuses	Gestational age	qPCR and PCR FHV-1	qPCR and PCR FPV and CPV	qPCR FIV	qPCR FeLV	qPCR FPV and CPV pool spleen/kidneys fetuses
F1	Normal	Normal	Process of mummification	45 days	-	+	-	-	-
F2	Haemorrhagic	Haemorrhagic areas	Macerated	undetermined	-	+	-	-	-
F3	Haemorrhagic	Haemorrhagic areas	Process of mummification, malformed skull	49 days	-	+	-	-	-
F4	Haemorrhagic	Haemorrhagic areas	Unformed eyes	60 days	-	+	-	-	-
F5	Normal	Normal	Normal	58 days	+	+	-	-	+
F6	Reddish	Petechiae and Unidentified amniotic fluid	Process of mummification	61 days	-	+	-	-	-
F7	Normal	Reddish	Process of mummification, Malformed fetuses with liquefied brain; Unconfigured skull, open abdomen	undetermined	-	+	-	-	-
F8	Normal	Placenta in degradation	Process of mummification,m alformed fetuses, open abdomen	undetermined	-	+	-	-	-

			and autolysed organs						
F10	Normal	Haemorrhagic	Normal	undetermined	-	+	-	-	-
F11	Haemorrhagic	Normal	Normal	53 days	-	+	-	-	-
F15	Haemorrhagic	Haemorrhagic	Heart, kidneys and brain haemorrhages	58 days	-	+	-	-	-
F16	Haemorrhagic	Haemorrhagic	Process of mummification, Icteric abdominal organs;	51 days	-	+	-	-	-
F17	Thickened walls and Haemorrhagic areas	-	Abortion at home, owner did not bring fetuses	-	-	+	-	-	-
F18	Normal	Haemorrhagic	Heart, liver, lung and kidneys Haemorrhagic	51 days	-	+	-	-	-
F19	Normal	-	Abortion at home, owner did not bring fetuses	-	-	+	-	-	-
F20	Haemorrhagic	Haemorrhagic	Process of mummification,Pe ricardium haemorrhage; Internal Haemorrhagic organs	47 days	-	+	-	-	-
F21	Haemorrhagic	Haemorrhagic	Reddish brain, intestinal and stomach icteric, small spleen,	53 days	-	+	-	-	-

F22	Adherent placenta and 1 placenta with sac and amniotic fluid adhered (with clot)	Bleeding areas	haemorrhagic organs Haemorrhagic liver and heart, lung with petechiae	undetermined	-	+	-	-	-
F23	Haemorrhagic	Haemorrhagic and with clots in amniotic fluid	Process of mummification, Haemorrhagic organ	50 days	-	+	-	-	-
F24	Haemorrhagic with a adherent Haemorrhagic placenta	Bleeding areas	Internal Haemorrhagic organs	55 days	-	+	-	-	-
F25	Normal	Haemorrhagic	Internal Haemorrhagic organs	undetermined	-	+	-	-	-
F27	Bloody secretion and clots	Haemorrhagic	Internal Haemorrhagic organs, Left kidney bigger and more Haemorrhagic than right	56 days	-	+	-	-	-
F28	Haemorrhagic	Haemorrhagic	Process of mummification, Internal bleeding and degenerating organs;	50 days	-	+	-	-	-

			Irregularly shaped kidneys; Pericardial bleeding						
F29	Haemorrhagic	Haemorrhagic	Mummification	undetermined	-	+	-	-	+
F30	Haemorrhagic	Haemorrhagic	Process of mummification	undetermined	-	+	-	-	-
F31	Normal	Haemorrhagic	Internal Haemorrhagic organs; Presence of bloody fetal fluid; Pericardial bleeding; Liver with different stains	50 dias	-	+	-	-	-

Table 3. Results blood count/blood chemistry for the queens with and without reproductive failures

Queens	N	L	M	↑ALT	↑AST
F1	+	+	-	+	+
F2	-	+	-	+	+
F3	-	-	+	-	+
F4	+	+	-	+	-
F5	+	+	+	-	+
F6	+	+	+	+	+
F7	-	-	-	-	+
F8	-	+	-	+	+
F10	-	+	+	+	+
F11	-	+	+	+	+
F15	+	-	+	-	-
F16	+	+	-	+	-
F17	-	+	+	+	-
F18	-	+	+	+	-
F19	-	+	-	+	+
F20	-	+	+	-	+
F21	-	-	-	-	+
F22	+	-	+	-	-
F23	+	+	-	+	-
F24	-	-	-	-	+
F25	+	+	-	-	-
F27	+	-	+	-	-
F28	-	+	-	+	+
F29	-	+	-	-	+
F30	-	+	-	-	+
F31	+	-	-	-	-
F32	+	-	-	-	-
F33	+	+	+	-	-
F34	+	+	-	-	-
F35	+	+	+	-	-
F36	+	-	-	-	-
F37	-	-	-	-	+
F38	+	-	+	+	-
F39	-	+	-	-	-
F40	-	-	+	-	-
F41	-	-	-	+	-
F42	-	-	-	+	-
F43	+	-	+	-	-
F44	-	-	-	-	-
F45	+	-	+	+	-
F46	-	-	+	-	+
F47	-	-	-	+	-

N=Neutrophilia; L=Lymphopenia; M=Monocytosis; ALT=alanine aminotransferase;
AST=aspartate aminotransferase

ANEXO A - QUESTIONÁRIO (adaptado de Lamm; Njaa, 2012)

- 1- A gata é primípara ou múltipara?
- 2- Qual o tamanho da ninhada e o número de filhotes acometidos?
- 3- A gata apresentou problema em ninhadas anteriores? Se sim, qual diagnóstico foi atribuído?
- 4- Existem outros animais na casa? Eles são usados para reprodução?
- 5- Existem gatas na casa que apresentam outros problemas reprodutivos incluindo infertilidade, aborto ou natimorto? Se sim, quais foram eles e quais procedimentos foram feitos para fechar diagnóstico?
- 6- Algum animal da casa apresenta doença do trato respiratório superior, diarreia ou outros sinais clínicos?
- 7- Qual o histórico vacinal da gata?
- 8- Qual o estado de saúde da parturiente e dos filhotes acometidos?
- 9- Qual o histórico de toda a vida dos pais (mãe e pai) da ninhada?
- 10- Tem algum teste genético completo (concluído)?
- 11- Houve introdução de animal(is) novo(s) na casa/gatil? Algum gato da casa viajou e retornou recentemente? Qual(is) protocolo(s) de quarentena são implementado(s)?

ANEXO B - CHECK LIST PARA ABORTO, NATIMORTO E MORTO FETAL EM GATOS (adaptado de Lamm e Njaa, 2012)

1. Concluído ficha de inscrição
 - Histórico completo, incluindo quaisquer lesões observadas
2. Tubos de sangue para sorologia(s)
 - Soro parturiente
 - Sangue parturiente
3. Em formalina para exame histopatológico
 - Placenta / / / / / / /
 - Fígado / / / / / / /
 - Intestino / / / / / / /
 - Baço / / / / / / /
 - Rim / / / / / / /
 - Pulmão / / / / / / /
 - Coração / / / / / / /
 - Cérebro / / / / / / /
 - Qualquer lesão, especificando a forma
4. Material para virologia e bacteriologia
 - Placenta / / / / / / /
 - Pulmão (apenas dos fetos) / / / / / / /
 - Coração (apenas dos fetos) / / / / / / /
 - Fluido fetal (apenas dos fetos) / / / / / / /
 - Intestino (apenas dos fetos) / / / / / / /
 - Fígado (apenas dos fetos) / / / / / / /
 - Rim (apenas dos fetos) / / / / / / /
 - Baço (apenas dos neonatos) / / / / / / /
 - Qualquer lesão, especificando a forma / / / / / / /
5. Tubo de sangue para cultura
 - Conteúdo estomacal (apenas dos fetos) / / / / / / /

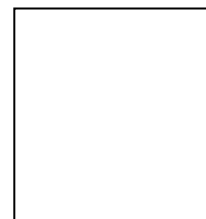
ANEXO C - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Convidamos o (a) Sr (a) _____ para participar da **PESQUISA DE AGENTES VIRAIS CAUSADORES DE ABORTAMENTO, NATIMORTALIDADE E MORTALIDADE NEONATAL EM GATAS**, sob a responsabilidade do pesquisador *João Marcelo Azevedo de Paula Antunes*, o qual pretende investigar a presença do *Vírus da imunodeficiência felina*, *Vírus da leucemia felina*, *Alpha herpesvírus felino* e *Vírus da panleucopenia felina* nas gatas atendidas no HOVET da UFERSA. Sua participação é voluntária e se dará por meio da permissão do uso de tecidos, fluidos, fetos abortados ou neonatos referentes ao seu animal de estimação. Se você aceitar participar, estará contribuindo para o maior conhecimento sobre agentes virais que causam problemas reprodutivos em gatos. Se depois de consentir em sua participação o Sr (a) desistir de continuar participando, tem o direito e a liberdade de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, seja antes ou depois da coleta dos dados, independente do motivo e sem nenhum prejuízo a sua pessoa. O (a) Sr (a) não terá nenhuma despesa e também não receberá nenhuma remuneração. Os resultados da pesquisa serão analisados e publicados, mas sua identidade e do seu animal não serão divulgadas, sendo guardada em sigilo. Para qualquer outra informação, o (a) Sr (a) poderá entrar em contato com o pesquisador no endereço Hospital Veterinário Jerônimo Dix-Huit Rosado Maia (HOVET) da Universidade Federal Rural do Semi-Árido pelo telefone (84) 3317-8310 ou poderá entrar em contato com a Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFERSA, na Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró-RN, telefone (84) 3317-8360.

Consentimento Pós-Informação

Eu, _____, fui informado sobre o que o pesquisador quer fazer e porque precisa da minha colaboração, e entendi a explicação. Por isso, eu concordo em participar do projeto, sabendo que não vou ganhar nada e que posso sair quando quiser. Este documento é emitido em duas vias que serão ambas assinadas por mim e pelo pesquisador, ficando uma via com cada um de nós.

Data: ____/____/____ Assinatura do participante



Impressão do dedo polegar
Caso não saiba assinar

Assinatura do Pesquisador Responsável