



COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS DE ELISA E NESTED-PCR NA EFICÁCIA PARA O DIAGNÓSTICO DO VÍRUS DA LEUCEMIA FELINA (FELV) EM GATOS

Gustavo Ribeiro Bonatto¹, Giovana Bizeus², Thierry Grima de Cristo², Paulo Eduardo Ferian³, Ubirajara Maciel da Costa³, Luiz Claudio Milette⁴, Cláudia Maria Flores Koelher⁵ e Renata Assis Casagrande⁶

¹ Acadêmico do Curso de Medicina Veterinária – CAV - bolsista PROBIC

² Acadêmico do programa de Pós-Graduação Em Ciéncia Animal – CAV

³ Professor do Departamento de Medicina Veterinária – CAV

⁴ Professor do Departamento de Produção Animal – CAV

⁵ Acadêmico do Curso de Medicina Veterinária – CAV

⁶ Orientadora, Departamento de Medicina Veterinária - CAV – renata.casagrande@udesc.br

Palavras-chave: Felinos. Doenças Infeciosas. Viremia. Técnica molecular.

A família *Retroviridae* possui grande importância na medicina veterinária, dentre eles, o vírus da leucemia felina (FeLV), que causa uma ampla variedade de síndromes clínicas nos felinos domésticos. Pertencente ao gênero *Gammaretrovirus*, é um vírus RNA de fita simples que cursa comumente com imunossupressão, anemia, leucemia e linfoma. Após a infecção na célula do hospedeiro, o RNA viral é transformado em DNA pró-viral pela ação da enzima transcriptase reversa e por meio da enzima viral integrasse é incorporado ao genoma do hospedeiro, que passará a expressar os genes virais (*env*, *gag* e *pol*) durante a replicação celular. Os principais testes diagnósticos para FeLV são o Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA) e a Reação em Cadeia de Polimerase (PCR). O primeiro é voltado para a detecção da proteína p27 e vai diagnosticar a doença na viremia primária ou infecção progressiva. O segundo vai diagnosticar a doença em qualquer momento da infecção por meio da detecção de DNA pró-viral. Levando em consideração as diferenças entre os métodos diagnósticos, este estudo propõe avaliar a eficácia entre ELISA e nested-PCR para detectar a infecção por FeLV. A comparação entre os diferentes métodos de diagnóstico está sendo realizada em uma amostra pré-estabelecida, proveniente de um estudo de prevalência para infecção por FIV e FeLV em gatos no Planalto de Santa Catarina. Fazem parte do estudo 274 amostras, resultante do cálculo para amostragem aleatória simples para populações infinitas. Para o cálculo foi utilizado o Software R *Foundation for Statistical Computing*, Vienna, Austria (Package EpiCalc), através da fórmula $n = \frac{Z \times Z [P(1-P)]}{D^2}$, onde Z se refere ao multiplicador (1,645) obtido por meio do intervalo de confiança desejado (90%), com base na distribuição normal, sendo P a prevalência esperada de 50% e D o erro máximo aceitável na estimativa (0,05). Foram incluídos no estudo gatos saudáveis e doentes, sem discriminação de idade, sexo ou raça, oriundos de consultas de rotinas do Hospital de Clínicas Veterinárias CAV-UDESC, levando em consideração a disponibilidade do tutor em participar do projeto. Amostras de sangue, de 3 a 5ml, obtidas por venopunção da jugular, foram armazenadas em tubos com e sem ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e encaminhadas para a obtenção de soro e após congeladas a -80°C para posterior análise. O diagnóstico para FeLV pelo método de ELISA foi realizado utilizando o kit SNAP FIV/FeLV Combo Test® (*IDEXX Laboratories*) que detecta a proteína p27 do FeLV nas amostras de soro. Para a extração do DNA e realização do nested-PCR utiliza-se amostras de sangue total, que após seu descongelamento, são imediatamente submetidas à extração de DNA por meio de kit comercial GeneElute TM Blood Genomic DNA® (*Sigma-Aldrich*), conforme orientação do fabricante. Após a extração, a concentração de cada amostra de DNA é mensurada por meio de espectrofotômetro Nano Drop 2000 (Thermo Scientific®) e diluído para manter-se à concentração mínima de 20ng/µL. Para detecção do DNA pró-viral do FeLV é utilizada a técnica de

nested-PCR com primers e condições de amplificação como descrito anteriormente por Miyazawa e Jarret (1997), para amplificar a região U3 LTR e gene gag. Os pares de primers U3-F (1): 5'-ACAGCAGAAGTTCAAGGCC-3' e G-R (1): 5'-GACCAGTGATCAAGGGTGAG-3' proveniente da região U3 LTR e do gene gag são preparados como primers externos para a primeira amplificação. Os primers U3-F (2): 5'-GCTCCCCAGTTGACCAGACT-3' e G-R (2): 5'-GCTTCGGTACCAAACCGAAA-3' proveniente da região U3 LTR e do gene gag são preparados como primers internos para a segunda amplificação. Para todos os ensaios são utilizados controles positivos e negativos a cada reação. Para a análise estatística os resultados foram tabulados em planilha Excel, elaborado tabelas de contingência 2x2 e realizado o teste Kappa-Cohen's, que estabelece o índice de concordância entre as técnicas de diagnóstico. Até o presente momento 50% (137/274) das amostras já foram submetidas a realização de nested-PCR e comparadas aos resultados obtidos previamente pelo ELISA. Para o teste de ELISA, 26,3% (36/137) dos felinos testados foram positivos e 73,3% (101/137) foram negativos. Com relação ao nested-PCR, 35% (48/137) dos felinos testados foram positivos e 65% (89/137) foram negativos. A análise em conjunto dos resultados de ambos os testes, é demonstrado na Tabela 1. Utilizando o teste *Kappa-Cohen's* para avaliar o grau de concordância entre essas variáveis, observou-se concordância substancial ($\kappa=0,76$ / $p<0,05$). Neste estudo, até o momento, foi possível identificar que um maior número de felinos foi positivo no nested-PCR, quando em comparação ao ELISA. Isso se deve ao fato de que o DNA pró-viral pode ser detectado em qualquer fase da infecção do vírus, ao contrário do ELISA que detecta a infecção viral apenas na fase progressiva. É de suma importância identificar os pacientes que possuem a infecção regressiva, devido a capacidade de reativação do pró-vírus inserido no DNA do hospedeiro a partir de situações que culminem com imunossupressão. Outro ponto importante se deve ao fato da capacidade de interação do DNA pró-viral com oncogenes celulares, podendo resultar neoplasmas em felinos mais velhos mesmo apresentando apenas a infecção regressiva. O único caso positivo no ELISA mas negativo no nested-PCR, demonstra que esse método não é livre de falha. Uma vez que os Retrovírus possuem uma alta taxa de mutação genética e resultados falsos-negativos podem ser observados. Levando em consideração o valor do teste *Kappa Cohen's*, até o presente momento foi observado concordância substancial entre os métodos de diagnóstico para o FeLV. Este resultado demonstra que assim como o método de ELISA o nested-PCR é de grande importância na detecção do vírus. Ambos os teste possuem boa aplicabilidade, contudo, deve-se conhecer os limites de cada teste, afim de realizar a melhor escolha para um diagnóstico preciso.

Tabela 1: Resultados parciais do ELISA e nested-PCR para detecção do vírus da leucemia felina (FeLV) em gatos

	ELISA		TOTAL
	Positivo	Negativo	
Nested-PCR	Positivo	25,5% (35/137)	9,5% (13/137)
	Negativo	0,7% (1/137)	64,2% (88/137)
TOTAL	26,3% (26/137)	73,7% (101/137)	100% (137/137)