

## **AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DA IMUNOCITOQUÍMICA (ICQ) NO DIAGNÓSTICO DO VÍRUS DA LEUCEMIA (FeLV) EM GATOS <sup>1</sup>**

Gustavo Ribeiro Bonatto<sup>2</sup>, Renata Assis Casagrande<sup>3</sup>, Thierry Grima de Cristo<sup>4</sup>, Taís Gaspar<sup>5</sup>, Giovana Biezu<sup>4</sup>, Aline da Rosa Maciel<sup>4</sup>, Paulo Eduardo Ferian<sup>6</sup>, Fabiano Zanini Salbego<sup>7</sup>

<sup>1</sup> Vinculado ao projeto “Avaliação da eficiência da imunocitoquímica (ICQ) no diagnóstico do Vírus da Leucemia (FeLV) em gatos”

<sup>2</sup> Acadêmico, Curso de Medicina Veterinária – CAV/UDESC - bolsista PROBIC;

<sup>3</sup> Orientadora, Departamento de Medicina Veterinária – CAV/UDESC – renata.casagrande@udesc.br

<sup>4</sup> Acadêmico, Programa de Pós-Graduação Em Ciência Animal – CAV/UDESC;

<sup>5</sup> Acadêmico, Curso de Medicina Veterinária – CAV/UDESC;

<sup>6</sup> Professor, Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais – PUC-MINAS;

<sup>7</sup> Professor, Departamento de Medicina Veterinária – CAV/UDESC;

Este trabalho objetiva padronizar e verificar a eficiência da Imunocitoquímica (ICQ) para detecção do Vírus da Leucemia Felina (FeLV) nas células de medula óssea de gatos domésticos, comparando com o ensaio de imunoenzimático (ELISA) e a reação em cadeia de polimerase (PCR), levado em consideração as limitações dos métodos de diagnóstico, bem como a falta de estudos que descrevam a técnica, ou que determinem a eficiência da ICQ para detecção do FeLV. Para tal, foram colhidas amostras e informações epidemiológicas de 188 gatos independente de higiene, gênero e raça, número mínimo encontrado de forma randômica sistemática, resultante do cálculo para amostragem aleatória simples para populações infinitas, utilizando o Software R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria (Package EpiCalc), com erro máximo aceitável de 0,05. Amostras de 5ml de sangue periférico, obtidas através da punção da jugular e acondicionadas em tubo com e sem ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), foram separadas em alíquotas para realização da nested-PCR, tendo como referência a região U3 LTR e o gene gag de um FeLV do subgrupo A. Para o ELISA, foram separadas alíquotas de soro para a detecção do antígeno p27 do FeLV a partir do kit SNAP FIV/FeLV Combo Test®. Foram colhidas também amostras de medula óssea utilizando cânulas padrão Jamshidi e Illinois, gauges 16 e 13, na tuberosidade deltoide do úmero. A medula óssea era acondicionada em uma placa de Petri, com 0,3ml de EDTA, para seleção das espículas medulares e preparo de esfregaços em lâminas silanizadas. A ICQ foi realizada utilizando o anticorpo primário anti-gp70 do FeLV, diluído a 1:500. O anticorpo primário foi sinalizado com o kit MACH 4 HPR Universal®, revelado com cromógeno DAB® e contracoradas com hematoxilina. Controles positivos e negativos foram acrescentados em cada reação. Os dados epidemiológicos foram distribuídos em tabelas de contingência no software Excel para avaliação da estatística descritiva, e a concordância entre as técnicas foi avaliada pelo teste de Kappa-Cohen e valores menores que 0 indicam nenhuma concordância; entre 0 e 0,19 baixa concordância; entre 0,20 e 0,39 regular concordância; entre 0,40 e 0,59 moderada concordância; entre 0,60 e 0,79 substancial concordância e entre 0,80 e 1,00 alta concordância. O presente trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) sob o nº 2306130319 (ID 000831). Dentre os gatos testados, 28,19% (53/188) foram positivos para o FeLV em ao menos um dos testes. Dos gatos avaliados, 42,027% (79/188) eram machos, destes 5,06% (4/79) eram castrados, e 57,97% (109/188) fêmeas, destas 9,17% (10/109) castradas, com idade média de 19,28 meses. Analisando

os métodos diagnósticos separadamente, a positividade para FeLV foi 11,2% (21/188) no ELISA, 18,1% (34/188) na ICQ e 26,6% (50/188) na nested-PCR (Tabela 1). Foi possível observar concordância substancial entre ICQ/ELISA e ICQ/PCR, e entre ELISA/PCR concordância moderada. A prevalência de FeLV encontrada neste trabalho é alta quando comparada com outros estudos, isso pode estar associado aos hábitos comportamentais da espécie, onde há contato íntimo e inúmeros confrontos interespecie nos períodos reprodutivos, expressado neste trabalho principalmente quando se aponta que o número de gatos castrados foi inversamente proporcional ao de gatos com acesso à rua. Quando comparados os diferentes métodos diagnóstico em pares, nota-se que 7,44% (14/188) animais foram positivos na ICQ e negativos no ELISA, e 15,95% (30/188) foram positivos na nested-PCR e negativos no ELISA, esses resultados estão associados aos casos de infecção regressiva, onde o vírus insere-se nas células da circulação sanguínea e nas células hematopoiéticas da medula óssea, não replicando por longos períodos, limitando a detecção da proteína p27 pelo teste de ELISA. Apenas um animal foi positivo no ELISA, mas negativo na ICQ, e 10,10% (19/188) foram positivos na nested-PCR, porém negativos na ICQ; para esses casos, acredita-se que os animais negativos na ICQ possivelmente desenvolveram a infecção próximo a realização do teste, e o vírus não teve tempo hábil para atingir e inserir-se nas células da medula óssea. Além disso, ressalta-se que a amostra obtida na colheita de medula óssea é uma representação muito pequena de um tecido muito amplo, o que pode vir a dificultar a identificação de pequenas quantidades de vírus distribuídas neste local. Um animal foi positivo no ELISA e negativo na nested-PCR, e três animais foram positivos na ICQ e negativos na nested-PCR, o que é explicado pela alta capacidade mutagênica do FeLV, capaz de promover alterações da estrutura genética viral e impedir a identificação do DNA pró-viral. Os diferentes métodos diagnósticos utilizados em conjunto, demonstraram grande significância na identificação de animais na fase regressiva da infecção, instituindo grande valor prognóstico ao paciente, visto que se torna exponencialmente mais susceptível ao desenvolvimento de neoplasias. Ressalta-se também que pode haver reativação do DNA pró-viral em situações de imunocomprometimento, desencadeando a forma progressiva da infecção. Todos os métodos de diagnóstico utilizados neste trabalho apresentaram-se úteis na detecção da infecção pelo FeLV, contudo, a associação dos diferentes métodos de diagnóstico é essencial para o estadiamento da infecção. A imunocitoquímica do esfregaço citológico de medula óssea provou ser um método de diagnóstico eficiente e inovador para detecção da infecção pelo FeLV, principalmente em animais com infecção regressiva.

**Tab. 1.** Resultados comparados dos métodos de diagnóstico e avaliação da concordância entre os testes para o diagnóstico da infecção pelo vírus da leucemia (FeLV) em gatos.

| Testes comparados | Resultados dos testes |            |             |              | Concordância (K) p<0,05 |
|-------------------|-----------------------|------------|-------------|--------------|-------------------------|
|                   | + / +                 | + / -      | - / +       | - / -        |                         |
| ICQ/ELISA         | 20 (10,63%)           | 14 (7,44%) | 1 (0,53%)   | 153 (81,38%) | 0,68                    |
| ICQ/PCR           | 31 (16,48%)           | 3 (1,59%)  | 19 (10,10%) | 135 (71,80%) | 0,67                    |
| ELISA/PCR         | 20 (10,63%)           | 1 (0,53%)  | 30 (15,95%) | 137 (72,87%) | 0,48                    |

**Palavras-chave:** Hematopatologia. Medula Óssea. Imunodiagnóstico.