

COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS DE ELISA E NESTED-PCR NA EFICÁCIA PARA O DIAGNÓSTICO DO VÍRUS DA LEUCEMIA FELINA (FeLV) EM GATOS¹

Taís Gaspar², Renata Assis Casagrande³, Giovana Bizeus⁵, Thierry Grima de Cristo⁵, Ubirarajara Maciel da Costa⁶, Luiz Claudio Miletti⁶, Gustavo Ribeiro Bonatto⁴ e Marcela Brüggemann de Souza Teixeira⁴

¹ Vinculado ao projeto “Comparação entre os métodos de ELISA nested-PCR na eficácia para o diagnóstico do Vírus da Leucemia Felina (FeLV) em gatos”

² Acadêmica do curso de Medicina Veterinária - CAV- Bolsista PIVIC/UDESC;

³ Orientador, Departamento de Medicina Veterinária – CAV- renata.casagrande@udesc.br

⁴ Acadêmico do Curso de Medicina Veterinária – CAV;

⁵ Programa De Pós-Graduação Em Ciência Animal – PPGCA;

⁶ Departamento de Medicina Veterinária – CAV;

O vírus da leucemia felina (FeLV), pertencente à família *Retroviridae*, é o vírus mais importante em gatos e é responsável por causar doenças neoplásicas como o linfoma e leucemia e imunossupressão. O FeLV é formado por RNA de fita simples que dentro da célula do hospedeiro, é transformado em DNA pró-viral pela enzima viral transcriptase reversa. Mediado pela enzima integrase, é inserido no genoma do hospedeiro e durante o processo de replicação celular formará novas partículas virais. Os métodos mais utilizados para o diagnóstico do FeLV são o ELISA, que detecta a proteína p27, e a reação em cadeia de polimerase (PCR), que detecta o DNA pró-viral. Devido a capacidade destes testes em diagnosticar o vírus em fases distintas da infecção, o objetivo deste estudo é comparar a eficácia entre os métodos de ELISA e nested-PCR no diagnóstico de FeLV. Portanto, foi utilizado uma amostra pré-estabelecida de um estudo de prevalência de FIV e FeLV realizado no Planalto de Santa Catarina. O estudo conta com uma amostra de 274 gatos, calculada utilizando o Software R *Foundation for Statistical Computing* (Package EpiCalc) (Thrusfield, 2007), por meio da fórmula $n = \frac{Z \times Z [P(1-P)]}{D^2}$ de amostragem aleatória simples para populações infinitas, aonde Z se refere ao multiplicador (1,645) obtido para o 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). Neste estudo foram incluídos, mediante a autorização dos tutores, gatos saudáveis e doentes, sem discriminação de idade, sexo ou raça, provenientes de consultas médicas do Hospital de Clínicas Veterinárias (HCV) da UDESC. Foram obtidas amostras de sangue, entre 3 a 5mL, por punção da veia jugular e armazenadas em tubos com e sem ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA). Após a colheita, as amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Patologia Clínica HCV/UDESC para a obtenção do soro, por meio de centrifugação 2000g por 10 minutos, e separação das alíquotas. As alíquotas, entre 0,5 e 1mL, de soro e sangue total com EDTA foram acondicionadas em microtubos e encaminhadas ao Centro de Diagnóstico Microbiológico Animal (CEDIMA), do CAV-UDESC, para armazenamento em freezer -80°C até o processamento. As amostras de soro foram testadas previamente pelo método de ELISA, utilizando o kit SNAP FIV/FeLV Combo Test® (IDEXX Laboratories). As alíquotas de sangue total foram submetidas à extração de DNA por meio de Kit comercial “GeneElute TM Blood Genomic DNA”, conforme orientação do fabricante. A concentração de DNA extraído foi mensurada através do espectrofotômetro Nano Drop 2000 (Thermo Scientific®) e diluído, para manter-se na concentração mínima de 20ng/μL. A detecção do DNA pró-viral do FeLV ocorreu pelo método de nested-PCR, utilizando-se a técnica descrita por Miyazawa e Jarret (1997), com algumas modificações. Para a amplificação da região U3 LTR e gene *gag* foram utilizados os primers U3-F (1): 5'-ACAGCAGAAGTTTCAAGGCC-3' e G-R (1): 5'-GACCAGTGATCAAGGGTGAG-3' como primers externos e os primers U3-F (2): 5'-GCTCCCCAGTTGACCAGACT-3' e G-R (2): 5'-

GCTTCGGTACCAAACCGAAA-3' como primers internos. Como controle positivo foi utilizado o DNA extraído de uma amostra de sangue de um felino positivo para FeLV, por meio de nested-PCR, cedido pelo Laboratório de Virologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFGRS). O controle negativo consistiu de todos reagentes do *mix* para o PCR, exceto o DNA que foi substituído por água ultra pura, livre de DNase. A eletroforese dos produtos de amplificação foi realizada em cuba horizontal, em gel de agarose a 2% e visualizadas mediante exposição à luz ultravioleta. Bandas com tamanho próximo a 600 pb foram consideradas positivas. Para a análise estatística, os resultados foram tabulados em planilhas no *softwer Excel* e submetidos ao teste Kappa utilizando o *software IBM SPSS Statistics 25.0* (IBM Corporation). Dos resultados obtidos, 31,8% (87/274) das amostras foram positivas para FeLV pelo nested-PCR e 22,3% (61/274) foram positivas no ELISA. Considerando as duas técnicas, 21,8% (60/274) das amostras foram positivas para FeLV tanto no ELISA quanto no nested-PCR, 9,8% (27/274) foram positivas apenas no nested-PCR e 0,36% (1/274) foi positiva apenas no ELISA como exposto na Tabela 1. O valor de Kappa obtido foi 0,74 (concordância substancial). O ELISA apresentou 98,4% de sensibilidade e 87,3% de especificidade quando comparado ao nested-PCR. O maior número de felinos positivos para FeLV no nested-PCR, o valor de K obtido abaixo do intervalo ideal de 0.80 - 1.00 para alta concordância proposta para o teste e a baixa especificidade do ELISA comparado ao nested-PCR são resultados que refletem a maior capacidade do nested-PCR em detectar o vírus, uma vez que este detecta o DNA-pró viral presente em qualquer fase da infecção, enquanto que para o ELISA é necessário existir replicação viral. O ELISA é o teste de rotina para o diagnóstico de FELV em felinos com sinal clínico, porém mesmo quando negativo é possível que os gatos apresentem o DNA-pró viral inserido no seu genoma, caracterizando a infecção regressiva. Devido a interação do DNA-pró viral com os oncogenes celulares é possível que estes felinos desenvolvam neoplasias, o que demonstra a aplicabilidade clínica do nested-PCR em casos discordantes. Além disso, o ELISA é utilizado como método único de diagnóstico em muitos estudos de prevalência, obtendo resultados subestimados em relação a verdadeira prevalência da infecção. A única amostra positiva apenas para o ELISA neste estudo, demonstra que o nested-PCR não é livre de falhas e resultados falsos-negativos podem ocorrer devido à alta taxa de mutação genética. Ainda assim, o nested-PCR mostra-se muito seguro. Os resultados aqui apresentados demonstram a importância de conhecer os limites de cada método, para a identificação dos casos em que devem ser empregados individualmente ou em conjunto, permitindo um diagnóstico preciso de FeLV.

Tabela 1. Resultados do ELISA e nested-PCR para detecção do Vírus da Leucemia Felina (FeLV)

	ELISA		TOTAL	
	+	-		
Nested-PCR	+	21,8% (60/274)	9,8% (27/274)	31,6%
	-	0,36% (1/274)	67,8% (186/274)	68,16%
TOTAL		22,1% (61/274)	77,6% (213/274)	100% (274/274)

Palavras-chave: Medicina Felina. Doenças Infeciosas. Reação em Cadeia de Polimerase.