# AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DA IMUNOCITOQUÍMICA (ICQ) NO DIAGNÓSTICO DO VÍRUS DA LEUCEMIA (FELV) E DA IMUNODEFICIÊNCIA (FIV) EM GATOS[1]

Marcela Brüggemann de Souza Teixeira[2], Renata Assis Casagrande[3], Gustavo Ribeiro Bonatto[4], Thierry Grima de Cristo[5], Giovana Biezus[5], Aline da Rosa Maciel[5], Paulo Eduardo Ferian[6], Luiz Claudio Miletti[7]

[1] Vinculado ao projeto "Avaliação da eficiência da imunocitoquímica (ICQ) no diagnóstico do vírus da leucemia (FELV) e da imunodeficiência (FIV) em gatos"
[2] Acadêmico do Curso de Medicina Veterinária – CAV – Bolsista PIBIC/CNPq
[3] Orientadora, Departamento de Medicina Veterinária – CAV – renata.casagrande@udesc.br
[4] Acadêmico do Curso de Medicina Veterinária – CAV
[5] Alunos do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal – CAV
[6] Professor, Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais – PUC-MINAS
[7] Professor, Departamento de Produção Animal e Alimentos, CAV-UDESC

O objetivo deste trabalho é padronizar e verificar a eficiência da imunocitoquímica (ICQ) para o diagnóstico de infecções pelos vírus da leucemia (FeLV) e imunodeficiência (FIV) felina a partir de amostras de medula óssea, comparando com o ensaio imunoenzimático (ELISA) e a reação em cadeia de polimerase (PCR) de amostras de soro e sangue. Dessa forma, foi determinado o número mínimo de 188 gatos de forma randômica sistemática, a partir 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. Destes animais, realizou-se inquérito epidemiológico e coleta de amostras de 5mL de sangue periférico através de venopunção jugular. As amostras de sangue eram acondicionadas em tubos com e sem ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA). Para ELISA, reservaram-se alíquotas de soro para detecção do antígeno p27 do FeLV e anticorpo anti-p24 gag do FIV, utilizando o kit SNAP FIV/FeLV Combo Test®. A nested-PCR para identificação do FeLV foi feita a partir de alíquotas de sangue total, tendo como referência a região U3 LTR e o gene *gag* de um FeLV do subgrupo A. As amostras de medula óssea foram colhidas usando cânulas padrão Jamshidi e Illinois, gauges 16 e 13, na tuberosidade deltoide do úmero. Em seguida, eram alocadas em placas de Petri com 0,3mL de EDTA, para seleção de espículas medulares e confecção esfregaços em lâminas silanizadas. A ICQ foi realizada com o anticorpo primário anti-gp70 do FeLV e anticorpo primário anti-p24 *gag* do FIV. Os anticorpos primários foram sinalizados com o kit MACH 4 HPR Universal®, revelados com cromógeno 3,3'-diaminobenzidina e contracorados com hematoxilina de Harris. Controles negativos e positivos foram utilizados em cada reação. Os dados epidemiológicos foram organizados em tabelas de contingência no software Excel e avaliados por meio da estatística descritiva, a concordância entre as técnicas diagnósticas foi avaliada pelo teste de Kappa Cohen, onde valores menores que 0 indicando 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 submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) sob o nº 2306130319 (ID 000831). De todos os animais testados, 57,98% (109/188) eram fêmeas e 42,02% (79/188) machos, 7,45% (14/188) castrados, 72,87% (137/188) tinham acesso a rua e a idade média era de 19,28 meses. Dos gatos testados, 28,19% (53/188) e 4,25% (8/188) foram positivos para FeLV e FIV respectivamente, em ao menos um dos testes. Os resultados positivos para FeLV foram de 11,2% (21/188) no ELISA, 18,1% (34/188) na ICQ e 26,6% (50/188) na nested-PCR, e para FIV, 1,06%

Apoio: CNPq Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico; fapesc Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina; GOVERNO DE SANTA CATARINA

(2/188) no ELISA e 3,72% (7/188) na ICQ. Observou-se concordância regular para ICQ/ELISA no diagnóstico de FIV, moderada para ELISA/PCR para FeLV e substancial para FeLV para ICQ/ELISA e ICQ/PCR (Tabela 1). O número de animais positivos para essas enfermidades neste estudo corresponde principalmente as vias de transmissão e as características epidemiológicas desses animais, que possuíam na sua maioria acesso a rua e não eram castrados, o que favorece o contato interespécie e a disseminação do vírus. Os resultados negativos no ELISA, mas positivos na ICQ e na nested-PCR apontam gatos com a forma de infecção regressiva do vírus, quando o mesmo está inserido nas células hematopoiéticas da medula óssea, mas não está se replicando, deixando de produzir e, consequentemente, dificultando a identificação da proteína p27 pelo ELISA. Para os animais positivos no ELISA e na nested-PCR, mas negativos na ICQ, possivelmente a infeção ocorreu próximo ao momento da coleta, não ocorrendo até então a infecção das células da medula óssea. Para os testes de nested-PCR negativos acompanhados de resultados positivos nos demais, considera-se que potencial mutagênico desses vírus tenha incutido na alteração da estrutura genômica, impedindo a identificação viral pelo PCR. Sendo assim, mostra-se de grande importância a combinação de meios diagnósticos para identificar em qual fase da infeção os animais estão, visto que o prognóstico está diretamente relacionado com esse fato. A fase da infecção determinará a predisposição ao aparecimento de neoplasias e desenvolvimento de infecções secundárias. Além disso, ao identificar um gato com infecção regressiva para FeLV, é fundamental considerar fatores imunodepressores que podem gerar uma reativação do DNA pró-viral latente nas células do hospedeiro, ocasionando no retorno à fase progressiva da infecção, favorecendo a viremia persistente. Para os animais positivos na ICQ mas negativos no ELISA para FIV, ressalta-se que o resultado falso-negativo neste último pode ocorrer devido ao nível insuficiente de anticorpos para detecção no momento do teste, caso a infeção tenha ocorrido em um período menor que 60 dias, ou ainda, se o paciente estiver na fase terminal da infecção podendo haver grande formação de imunocomplexos, que reduzem a disponibilidade de anticorpos para detecção pelo ELISA. Conclui-se que todos os métodos descritos se mostram eficazes na detecção da infecção por FeLV e FIV, e a combinação destes é necessária para o estadiamento e estabelecimento do prognóstico de cada paciente. Ainda, a ICQ a partir de amostras de medula óssea apresentou-se como ferramenta diagnóstica eficiente e inovadora para detecção do FeLV e FIV, inclusive em animais falso-negativos pelo ELISA.

**Tabela 1.** *Resultados pareados dos métodos de diagnóstico e avaliação da concordância entre os testes para o diagnóstico da infecção pelos vírus da leucemia (FeLV) e imunodeficiência (FIV) felina.*

| Vírus | Testes Comparados | Resultado dos testes | | | | Concordância (K) p<0,05 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | +/+ | +/- | -/+ | -/- | |
| FeLV | 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 |
| FIV | ICQ/ELISA | 1 (0,53%) | 6 (3,19%) | 1 (0,53%) | 180 (95,74%) | 0,22 |

**Palavras-chave:** imunocitoquímica. infecção viral, hematopatologia.