

PROTOCOLO PARA DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE IMUNODEFICIÊNCIA E LEUCEMIA EM GATOS DOMÉSTICOS

(Protocol for molecular diagnosis of immunodeficiency and leukemia, in domestic cats)

Sarah Ary CENI^{1*}; Bárbara Helena de Lima BRAZ¹; Karina Gatti De ABREU¹; Marcos Antônio Cruz de SOUSA¹; Carlos Henrique LOBO²; Anderson Pinto ALMEIDA^{1,2}

¹Faculdade Terra Nordeste (FATENE), Rua Coronel Correia, 1119. Caucaia/Ce.
CEP: 61.600-000; ²OnCells Biotecnologia. *E-mail: sarahary@hotmail.com

RESUMO

Diversas afecções que acometem os felinos domésticos, como as retrovirose, não possuem tratamento efetivo. Tal fato torna relevante o estudo dessas doenças, em virtude da baixa eficácia de cura e caráter majoritariamente vitalício. Entre as retrovirose que mais acometem os felinos estão a imunodeficiência felina (FIV) e a leucemia felina (FeLV). O diagnóstico é obtido pela associação do exame clínico, geralmente inconclusivo, com exames laboratoriais complementares. Testes moleculares, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), são eficientes para a detecção do DNA proviral e podem ser utilizados na rotina diagnóstica. Diante disso, o objetivo deste estudo foi comprovar a eficiência do protocolo molecular Nested PCR para diagnosticar FIV e FeLV. Para tal, amostras de sangue e/ou medula de 41 gatos domésticos foram coletadas por meio de punção venosa ou de medula e encaminhadas ao laboratório Oncells Biotecnologia. Os seguintes pares de primers foram adotados para o Nested PCR: FF1 e FF2 para o primeiro ciclo, com um amplicon de 1325pb para FIV e 490pb para a FeLV. Para o segundo foi utilizada a combinação F14, F15, FE4 e FE7, com um amplicon de 1138pb para FIV e 306pb para FeLV. As bandas correspondentes às esperadas para FeLV foram detectadas pela observação dos géis, porém, além de outras bandas inespecíficas, não foram observadas bandas correspondentes à FIV. Os resultados confirmam a capacidade de detecção do patógeno da FeLV pela técnica empregada. No entanto, novos ajustes do protocolo são necessários.

Palavras-chaves: Retrovirose, nested PCR, felinos.

ABSTRACT

Several affections that affect domestic cats, such as retroviruses, do not have effective treatment. This fact makes the study of these diseases relevant; due to the low healing efficacy and mostly lifelong character. Among the retroviruses that most affect felines are feline immunodeficiency (FIV) and feline leukemia (FeLV). The diagnosis is obtained by associating the clinical examination, which is generally inconclusive, with complementary laboratory tests. Molecular tests, such as the polymerase chain reaction (PCR), are efficient for proviral DNA detection and can be used in the diagnostic routine. Therefore, this study aimed to prove the efficiency of the molecular protocol Nested PCR to diagnose FIV and FeLV. For this purpose, blood and/or bone marrow samples from 41 domestic cats were collected through venipuncture or bone marrow and sent to the Oncells Biotechnology laboratory. The following primer pairs were adopted for the Nested PCR: FF1 and FF2 for the first cycle, with an amplicon of 1325bp for FIV and 490bp for FeLV. For the second, the combination F14, F15, FE4, and FE7 was used, with an amplicon of 1138bp for FIV and 306bp for FeLV. The bands corresponding to those expected for FeLV were detected by observing the gels; however, in addition to other non-specific bands, bands corresponding to FIV were not observed. The results confirm the ability to detect the FeLV pathogen by the technique employed. Nevertheless new protocol adjustments are required.

Keywords: Retroviruses, nested PCR, felines.

INTRODUÇÃO

O retrovírus felino da leucemia felina (FeLV) e da imunodeficiência felina (FIV) integram a família Retroviridae e estão entre os mais comuns e relevantes causadores de doenças infecciosas em gatos, sendo encontrados em todo o mundo, com soroprevalência

variável, dependendo da geografia e dos fatores de risco (LUTZ, 1990). Em felinos domésticos, o gênero *Gammaretrovirus* causa a Leucemia viral felina (FeLV) por sua vez a Imunodeficiência felina (FIV) é causada pelos retrovírus do gênero *Lentivirus* (SOUZA e TEIXEIRA, 2003).

Os retrovírus se replicam em tecidos de alta taxa metabólica, onde a infecção por FeLV causa doenças mieloproliferativas e degenerativas, por sua vez a FIV causa doença imunossupressora. Eles vão apresentar caracteristicamente a síntese do DNA (pró-vírus) a partir do RNA, onde esta transcrição é mediada pela enzima transcriptase reversa (WAGNER e HEWLETT, 1999; TRABULSI e ALTERTHUM, 2008).

É recomendado, segundo a Associação Americana de Médicos de Felinos (American Association of Feline Practitioners - AAFP), que o teste para o FIV e o FeLV deve fazer parte dos dados básicos mínimos de todo gato doente ou não, mesmo que já tenha sido testado e negativado (LEVY *et al.*, 2005).

No que diz respeito à FeLV, alguns animais podem permanecer infectados de modo latente por meses ou anos. Esses gatos apresentam resultados negativos aos testes de leucemia felina (ELISA, IFI, RT-PCR, imunocromatografia ou isolamento viral), mas podem permanecer positivos por toda a vida por meio do teste de PCR, que detecta o provírus integrado ao genoma do hospedeiro (JERICO *et al.*, 2015).

Já para o vírus da FIV, diversos subtipos do vírus já foram identificados, a saber: A, B, C, D e E. Adicionalmente, podem ocorrer mutações intra-hospedeiro do vírus. O FIV apresenta, no “gene env”, uma região hipervariável, o que resulta em diferenças nos determinantes antigênicos, o que representa um sério obstáculo ao desenvolvimento de vacinas, capazes de proteger contra os subtipos mais prevalentes (ADAM e DANDRIEUX, 2011).

A infecção por esses retrovírus pode ser diagnosticada através de imunoenaios enzimáticos (ELISA) tradicionais, kits rápidos de ELISA (testes rápidos), *Western blot*, imunofluorescência indireta (IFI), reação em cadeia da polimerase (PCR) e isolamento viral (ADAM e DANDRIEUX, 2011). Entretanto, os testes moleculares como a reação em cadeia da polimerase estão cada vez mais sendo utilizados devido às vantagens sobre os testes sorológicos, uma vez que, além de detectarem e identificarem os agentes virais, permitem também caracterizá-los geneticamente (TANDON *et al.*, 2008).

Devido à possibilidade de infecções duplas FIV-FeLV e às vantagens de uma detecção conjunta de ambos os retrovírus, o objetivo do presente trabalho foi validar um protocolo adaptado de diagnóstico molecular duplo por nested PCR para FIV e FeLV.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais experimentais

Foram utilizados no estudo gatos oriundos de clínicas parceiras, na cidade de Fortaleza/CE. Um total de 41 amostras, das quais 40 de sangue e 1 de medula foram encaminhadas para o Laboratório Oncells Biotecnologia, onde foram realizadas as extrações de DNA, reações de PCR e análises de eletroforese.

Extração de DNA das amostras

A extração de DNA foi realizada nas amostras de sangue total e medula, utilizando a técnica de lise alcalina modificada, onde, para cada amostra, foram feitas alíquotas de 200µL e 400µL de sangue ou 25µL, 50µL e 100µL de medula. Às amostras foram adicionadas 300µL de solução de lavagem, seguido de centrifugação a 3.000g por 1 minuto em centrífuga (GmClab®-Gilson), sendo o sobrenadante descartado. Após 4 lavagens, o pellet foi resuspenso em 60µL de solução com base em NaOH e incubado a 65° por 10 minutos em termociclador (T100[©] Bio- Rad) para lise das células e obtenção do DNA. Após essa etapa, foi adicionado 60µL de solução com base em TrisHCl para a inativação do processo de lise alcalina, obtendo-se um total de 120µL de amostra de DNA extraído, dos quais 2µL serão utilizados para cada reação.

Amplificação por Nested PCR

Para a primeira PCR utilizamos os primers FF1 E FF2 (Tab. 01), onde foi adotado o seguinte perfil de ciclo térmico: 94 °C por 7 minutos, para denaturação inicial, seguido de 35 ciclos a 94 °C por 1 minuto para denaturação, 51 °C por 1 minuto para anelamento e 72 °C por 3 minutos para extensão com 10 minutos de extensão final a 72 °C.

Tabela 01: Sequência de primers (*forward and reverse*) usados no experimento.

Nome	5'-3'	Amplificação
FF1	AMCCRTTATTRGGRAGAG	1325 pb para FIV
FF2	CAMAGYAGCATGGATRMT	490 pb para FeLV

(Adaptado de ARJONA *et al.*, 2007).

Na segunda PCR (Nested), foram utilizados os primers F14, F15, FE4 e FE7 (Tab. 02) onde foi adotado o seguinte perfil de ciclo térmico: 94 °C por 7 minutos, para denaturação inicial e 94 °C por 1 minuto, 51 °C por 1 minuto, 72 °C por 90 segundos, para denaturação, anelamento e extensão respectivamente durante 25 ciclos e 72 °C por 10 minutos, para extensão final.

Tabela 02: Sequência de primers (*forward and reverse*) usados no experimento.

Nome	5'-3'	Amplificação
F15	CAATGGCCATTAAATGAA	1138 pb para FIV
F14	AGAGAGGCCTGGAATCAAAT	306 pb para FeLV
FE7	GAAAGTACACAAAAACAGGAG	257 pb para Retrovírus Endógeno
FE4	CTTAAGTCCTGCACTGG	

(Adaptado de ARJONA *et al.*, 2007).

Ambas as reações de PCR foram realizadas utilizando mix de reação comercial (MasterMix PCR Convencional, QuatroG Biotecnologia) cuja composição é: Taq DNA polimerase recombinante 1,5U, tampão de reação 10x (100mM de Tris-HCl, pH 8.5 e 500mM

de KCl), 1,7mM de MgCl₂, 0,2mM de dNTPs reações de 25uL. Para visualização dos resultados foi utilizada a eletroforese em gel de agarose (1,5% em solução de tampão Tris Ácido Acético e EDTA - TAE).

Eletroforese em gel de agarose

Para a eletroforese foram adicionados 5µL de tampão de corrida contendo marcador gel red (Uniscien-ce[®]) aos 25µL na reação de PCR, onde 10µL dessa mistura foram aplicadas em gel de agarose 1,5% (Uniscience[®]) em solução TAE (QuatriG[®]) em corrente elétrica de 65 Volts. Após 30 e 60 minutos, foi realizada a visualização dos géis sobre lampada UV (Transiluninator Benchtop UVP[®]) com comprimento de onda de 302 nanômetros, onde os produtos da amplificação foram comparados com os ladders de 50pb e 100pb (QuatroG[®]).

Análise estatística

Foi aplicada a estatística descritiva simples, onde os animais foram classificados como positivos ou negativos para cada um dos genes testados de acordo com a presença de uma ou mais bandas no gel de eletroforese. Nesse sentido, foram considerados resultados positivos a presença de bandas simultânea ou individuais na altura de 1325pb e/ou 1138pb para FIV, 490pb e/ou 306pb para FELV e/ou 257pb para o retrovirus endógeno. Para garantir a qualidade do DNA de cada amostra, o resultado Nome 5'-3' Amplificação GAPDH F TTCCACGGCACAGTCAAG 115 pb GAPDH R ACTCAGCACCCAGCATCAC positivo na extração pôde ser evidenciado com a presença da expressão do GAPDH.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A extração das amostras foi confirmada através da observação da expressão do Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) (Fig. 01).



Figura 01: Expressão do GAPDH em amostras de gatos. (Fonte: Acervo pessoal, 2018)

O GAPDH representa um gene de referência universal expresso que tem muitos papéis biológicos além de sua função na glicólise. Um ensaio GAPDH foi desenvolvido para

a normalização precisa da expressão do RNA mensageiro felino (mRNA) (LEUTENEGGER *et al.*, 1999), validado através da comparação com outros potenciais genes de referência de mRNA felino (KESSLER *et al.*, 2009).

Posteriormente, o GAPDH foi aplicado como controle de qualidade para testar a integridade do gDNA e a ausência de inibidores da PCR (LEUTENEGGER, 1999). Novacco *et al.* (2011) e Wolf-Jackel *et al.* (2012) sugeriram que uma única cópia do pseudogene GAPDH está presente no genoma felino e que o ensaio GAPDH felino pode, portanto, ser usado para quantificar o número de células em amostras de felinos, confirmando que o protocolo de lise alcalina é efetivo para a extração de DNA tanto de sangue quanto de medula de felinos.

Apesar de se tratar de retrovírus, optou-se por realizar a extração do DNA total e não do RNA, visto que a reação em cadeia da polimerase (PCR) é um método eficiente para a detecção do DNA proviral, sintetizado a partir do RNA dos retrovírus (RIMSTAD e UELAND, 1992; CALDAS *et al.*, 2000; MIYAZAWA, 2002) Ainda, o DNA é um ácido nucleico mais estável e menos sujeito à degradação que o RNA, além de possibilitar a utilização de protocolos de extração mais simples e baratos.

Todos os animais em questão apresentaram retrovírus endógeno. De acordo com Little (2005), praticamente todos os gatos têm material genético retroviral endógeno que normalmente está presente no genoma e é hereditário. Esses fragmentos de DNA endógeno não são patogênicos em si e não produzem partículas virais infecciosas. Entretanto, podem recombinar-se com retrovírus exógenos, como o FeLV-A, e aumentar a patogenicidade do vírus infectante.

Para o presente trabalho, optou-se pela utilização da técnica de PCR nested, que consiste na realização de duas reações de PCR com primers externos e internos, onde o produto da primeira reação com par de primers externos é amplificado na segunda reação, que utiliza par de primers internos, sendo uma técnica qualitativamente e quantitativamente superior à PCR simples, com ganhos de especificidade e quantidade do material amplificado (CALDAS *et al.*, 2000).

No que diz respeito à FeLV dos 41 animais analisados, 13 foram negativos e 32 positivos, confirmando que a FeLV é uma afecção comum em felinos (Fig. 02 e 03).

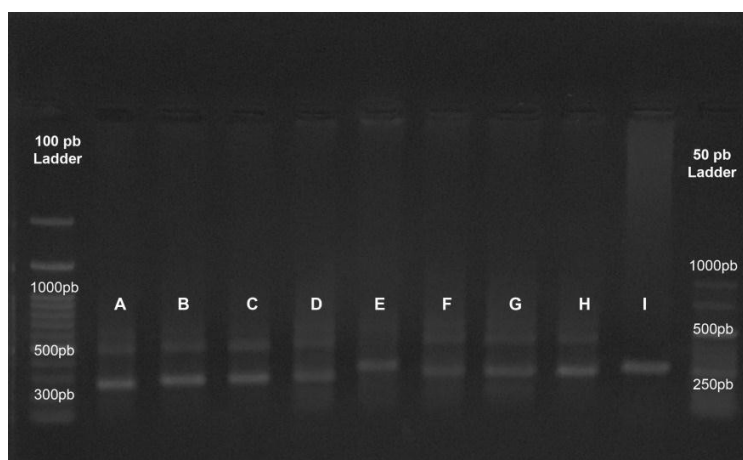


Figura 02: Primeiro ciclo Nested PCR realizado em amostras de felinos para diagnóstico de FIV e FeLV. (Fonte: Acervo pessoal, 2018)

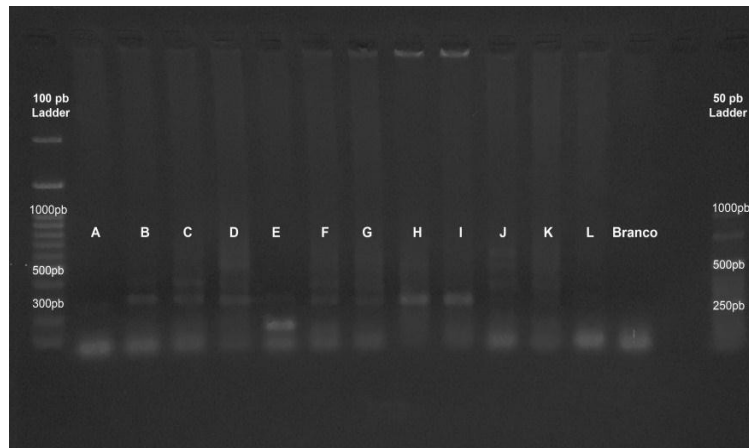


Figura 03: Segundo ciclo Nested PCR realizado em amostras de felinos para diagnóstico de FIV e FeLV. (Fonte: Acervo pessoal, 2018)

Quando realizado por uma equipe bem treinada em um laboratório bem equipado, a PCR pode ser considerada a metodologia mais sensível para detecção de FeLV sendo, inclusive, a técnica de eleição (NORSWORTHY *et al.*, 2010). Há também alguns detalhes de execução importantes que podem promover um resultado errôneo do teste rápido, como a utilização de *kits* em temperatura inadequada, ler o resultado no tempo incorreto e usar sangue total para a realização do teste (HARTMANN, 2012).

De acordo com Levy *et al.* (2005), é clara a relevância do teste quando menciona que indivíduos positivos nem sempre apresentam sinais clínicos da doença, mas permanecem portadores e disseminadores do vírus dentro da população. No entanto, para que o teste dos gatos se torne rotina nos consultórios, é imprescindível a existência de uma metodologia acurada com alta sensibilidade e especificidade, para que a detecção rápida dos vírus possa ser aplicada de forma prática e confiável pelo médico veterinário durante a consulta de rotina.

Em contrapartida, não foram observados animais positivos para FIV, sugerindo algumas hipóteses, tais quais: os animais em questão não eram portadores do vírus para FIV, o que seria menos provável devido ao número de animais e suas condições clínicas; ou o protocolo utilizado necessita passar por ajustes, pois, não foi eficiente para a detecção da FIV nas amostras testadas. O único animal de amostra medula foi negativo para FIV e positivo para FeLV.

CONCLUSÕES

A Nested PCR é uma técnica que permite de maneira mais sensível e versátil a detecção de múltiplas doenças, o que faz dela uma ferramenta valiosa na clínica de pequenos animais. A técnica de Nested PCR apresenta eficiência para a detecção de FeLV. Já para FIV são necessários ajustes no protocolo da técnica no sentido de proporcionar a dupla detecção de FIV e FeLV.

REFERÊNCIAS

- ADAM, F.; DANDRIEUX, J. Diagnostic testing for detection of feline retroviruses. In *Practice*, v.33, n.10, p.498–506, 2011.
- ARJONA, A.; BARQUERO, N.; DOMÉNECH, A.; TEJERIZO, G.; COLLADO, V.M.; TOURAL, C.; MARTÍN, D.; GOMEZ-LUCIA, E. Evaluation of a novel nested PCR for the routine diagnosis of feline leukemia virus (FeLV) and feline immunodeficiency virus (FIV). *Journal of Feline Medicine and Surgery*, v.9, n.1, p.14-22, 2007.
- CALDAS, A.P.F.; LEAL, E.S.; SILVA, E.F.A.; RAVAZZOLO, A.P. Detecção do provírus da Imunodeficiência Felina em gatos domésticos pela técnica de reação em cadeia da polimerase. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.20, n1, p.20-25, 2000.
- COURCHAMP, F.; POINTER, D. Feline immunodeficiency virus: an epidemiological review. *Comptes rendus de l'Academie des sciences. Serie III, Sciences de la vie*, v.317, n.12, p.1123-1134, 1994.
- HARTMANN, K. Clinical Aspects of Feline Retroviruses: A Review. *Viruses*, v.4, n.12, p.2684-2710, 2012.
- JERICÓ, M.M.; ANDRADE NETO, J.P.; KOGIKA, M.M. *Tratado de medicina interna de cães e gatos*. 1ª ed., São Paulo: Rocca, 2015. 2394p.
- KESSLER, Y.; HELFER-HUNGERBUEHLER, A.K.; CATTORI, V.; MELI, M.L.; ZELLWEGER, B.; OSSENT, P.; RIOND, B.; REUSCH, C.E.; LUTZ, H.; HOFMANN-LEHMANN, R. Quantitative TaqMan® real-time PCR assays for gene expression normalisation in feline tissues. *BMC molecular biology*, v.10, n.1, p.106-120, 2009.
- LEUTENEGGER, C.M.; MISLIN, C.N.; SIGRIST, B.; EHRENGRUBER, M.U.; HOFMANN-LEHMANN, R.; LUTZ, H. Quantitative real-time PCR for the measurement of feline cytokine mRNA. *Veterinary immunology and immunopathology*, v.71, n.3/4, p.291-305, 1999.
- LEVY, J.K.; SCOTT, H.M.; LACHTARA, J.L.; CRAWFORD, P.C. Report of the American Association of Feline Practitioners and Academy of Feline Medicine Advisory Panel on Feline Retrovirus Testing and Management. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, v.3, n.5, p.371-376, 2005.
- LITTLE, S.E. Feline immunodeficiency virus testing in stray, feral, and cliente- owned cats of Ottawa. *Canadian Veterinary Journal*, v.46, n.10, p.898-901, 2005.
- LUTZ, H.; LEHMANN, R.; WINKLER, G.; KOTTWITZ, B.; DITTMER, A.; WOLFENBERGER, C.; ARNOLD, P. Feline immunodeficiency virus in Switzerland: clinical aspects and epidemiology in comparison with feline leukemia virus and coronaviruses. *Schweizer Archiv fur Tierheilkunde*, v.132, n.5, p.217-225, 1990.
- NORSWORTHY, G.; YAMAMOTO, J.K.; LITTLE, S.; ZWIJNENBERG, R. *Practitioner's Update: Feline Retrovirus Disease*. Ontario: Animal Health Publishing., v.1, n.1, p.1-12, 2010.
- NOVACCO, M.; BORETTI, F.S.; WOLF-JACKEL, G.A.; RIOND, B.; MELI, M.L.; WILLI,

B.; LUTZ, H.; HOFMANN-LEHMANN, R. Chronic, “Candidatus Mycoplasma turicensis” Infection. *Veterinary Research*, v.42, n.1, p.1-7, 2011.

RIMSTAD, E.; UELAND, K. Detection of feline immunodeficiency virus by a nested polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods*, v.36, n.3, p.239-248, 1992.

SOUZA, H.J.M.; TEIXEIRA, C.H.R. *Medicina e Cirurgia Felina*. 1ª ed., Rio de Janeiro: Ed. Lf Livros, 2003. 475p.

TANDON, R.; CATTORI, V.; PEPIN, A.C.; DONALD, M.M.; DOHEER, M.G.; LUTZ, H.; HOFMANN-LEHMANN, R. Association between endogenous feline leukemia virus loads and exogenous feline leukemia virus infection in domestic cats. *Virus Research*., v.135, n.1, p.136-143, 2008.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. *Microbiologia*. 5ª ed., São Paulo: Ed. Atheneu, 2008. 760p.

WAGNER, E.K.; HEWLETT, M.J. *Retroviroses In: Basic Virology*. 1ª ed., Malden: Ed. Blackwell Science, p.383-405, 1999. 466p.

WOLF-JACKEL, G.A.; CATTORI, V.; GERET, C.P.; NOVACCO, M.; MELI, M.L.; RIOND, B.; BORETTI, F.S.; LUTZ, H.; HOFMANN-LEHMANN, R. Quantification of the humoral immune response and hemoplasma blood and tissue loads in cats coinfecting with “Candidatus Mycoplasma haemominutum” and feline leukemia virus. *Microbial pathogenesis*, v.53, n.2, p.74-80, 2012.