

PADRONIZAÇÃO DA PCR EM TEMPO REAL PARA FELV

TAISE VENCATO ISQUIERDO¹; PAOLA RENATA JOANOL DALLMANN²;
DIAGO DUTRA LIMA³, ANDRÉIA CAROLINE MACIEL⁴, KAUÊ RODRIGUEZ
MARTINS⁵, RODRIGO CASQUERO CUNHA⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – taisevancato@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – dallmannpaola@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – diagolima@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – mvandreiamaciel@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – kauerodriguez@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – rodrigo.cunha@ufpel.edu.br

1. INTRODUÇÃO

As técnicas moleculares têm alcançado espaço crescente nas especialidades médicas, oferecendo uma variedade de exames que auxiliam a prever, predizer, triar, diagnosticar e no prognóstico de inúmeras enfermidades. Diante disso, tais técnicas representam uma importante ferramenta para detectar o agente etiológico de maneira ágil e eficaz e consequentemente, os exames têm sido cada vez mais procurados, uma vez que buscam garantir o melhor cuidado com a saúde (YANG e ROTHMAN, 2004).

Dentre estas enfermidades está o Virus da leucemia felina (FeLV), que é transmitida horizontalmente entre gatos domésticos através de secreções corporais e foi o primeiro retrovírus a demonstrar causar tanto distúrbios neoplásicos quanto degenerativos. Assim como outros retrovírus, a FeLV induz imunossupressão em seu hospedeiro. Embora o mecanismo de imunopatogênese não seja claro, as proteínas do envelope viral podem estar envolvidas (BROWN et al., 2008).

O processo de diagnóstico molecular envolve a coleta de amostras biológicas, como sangue, saliva, tecidos, que são analisadas em laboratório por meio de técnicas que incluem a extração do material genético, DNA ou RNA. Além da amplificação de regiões específicas, da identificação de mutações ou de alterações genéticas por meio de métodos como Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), sequenciamento genético e análise de expressão gênica (PATRINOS, et al., 2017).

A PCR, por ser um teste molecular, permite a detecção do vírus na fase inicial e por apresentar elevada especificidade e sensibilidade detecta o agente em

diferentes fases da viremia, sendo o animal portador ou com infecção aguda. Além disso, por meio da PCR quantitativa, é possível identificar a viremia no paciente e acompanhar a evolução do quadro clínico com o tratamento aplicado. (ROJKO et al., 1979; HARTMANN, 2006).

Os testes moleculares, assim como, todos os outros testes laboratoriais, não estão livres de erros, principalmente, durante o período pré-analítico, ou seja, o período que antecede a análise laboratorial, do pedido solicitado à coleta e ao transporte das amostras. A quantidade e a qualidade dos ácidos nucléicos extraídos estão diretamente relacionadas à maneira de como as amostras foram coletadas, embaladas e transportadas até o laboratório, bem como ao método de extração escolhido e de amplificação devem ser padronizados. O objetivo deste trabalho foi estabelecer protocolo para detecção de amostras suspeitas de FeLV em felinos domésticos.

2. METODOLOGIA

Antes deste trabalho, a padronização para a PCR em tempo real de FeLV ainda não existia no laboratório. Esse processo envolveu uma série de etapas, incluindo o teste de protocolos, busca de amostras positivas e negativas previamente testadas, validação dos métodos e treinamento da equipe.

Foi necessário a extração de RNA das amostras recebidas e posteriormente a síntese de cDNA, sendo essa uma molécula mais estável cujo proporciona a realização da técnica da PCR. Para a síntese de cDNA foi necessário um kit comercial GoScript™ Reverse Transcriptase (Promega, Madison, Wisconsin, EUA), seguindo as recomendações do fabricante. Para a técnica da PCR em tempo real foi utilizado um mix de reagentes contendo: 2 μ l H2O DNase e RNase Free, 5 μ l MasterMix PCR Tempo SYBR Green/ROX, 1 μ l Primer N-ENV Forward (10 μ M), 1 μ l Primer N-ENV Reverse (10 μ M) segundo Brown et al., (2008), 1 μ l de produto de cDNA, sendo assim o volume final de reação de 10 μ l, sendo este volume em cada poço da microplaca de 96 poços, em seguida foi selada e centrifugada. A termociclagem consistiu de 2 min a 95 graus, seguido de 40 ciclos de 95 graus por 15 segundos, 58,7 por 1 minuto e uma curva de decaimento iniciando a 65°C com incremento de 0.5 graus a cada 2 segundos até atingir a temperatura de 95°C. os resultados foram observados no programa CFX naestro (Biorad, Hercules, Califórnia, EUA)

Após a realização da padronização da PCR, foram recebidas amostras de quinze gatos e todos foram testados para FeLV. Destes, oito tiveram resultado positivo para a doença, sendo em um destes observada a coinfecção com '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*', um achado relevante para a compreensão das infecções em felinos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante os casos testados, destacou-se uma amostra sanguínea de felino previamente testado com teste rápido, sendo diagnosticado como positivo pelo veterinário responsável. A amostra foi encaminhada ao laboratório para diagnóstico molecular. No entanto, após a realização da PCR em tempo real, não foi detectado RNA viral, sendo considerado que, ao teste rápido, o diagnóstico foi provavelmente falso-positivo.

A veterinária responsável pelo atendimento relatou que este felino acabou sendo vítima de abandono, pois quando foi descoberto o resultado do teste rápido não houve mais interesse do tutor em cuidar do animal. Dessa forma, fica evidente a importância do teste confirmatório, que poderia ter mudado o destino deste animal. Além de salientar o quanto um tutor deve ser responsável na hora de assumir os cuidados de um animal, pois estes não podem ser tratados como objetos e descartados da forma como ocorreu neste caso. A veterinária responsável também relatou que não foi possível retomar o contato com a tutora após a realização da PCR em tempo real, pois, uma vez que o teste rápido deu positivo, a tutora impossibilitou o contato.

De acordo com a bula do teste rápido para detecção do antígeno da leucemia felina, pode haver a necessidade de "a utilização de outros testes confirmatórios", ou seja, por mais que o teste rápido seja uma opção simples e prática, há possibilidades de resultados falso-positivos ou falso-negativos causados por fatores variados como por exemplo filhotes, devido à detecção de anticorpos maternos adquiridos pela amamentação.

4. CONCLUSÕES

É possível perceber que a biologia molecular é muito importante dentro da ciência como um contexto geral, pois entendemos diversos aspectos dos agentes

etiológicos de inúmeras doenças que acometem animais e seres humanos. A PCR, por ser um teste molecular, permite a detecção do vírus na fase inicial e por apresentar elevada especificidade e sensibilidade detecta o agente em diferentes fases da viremia, sendo o animal portador ou com infecção aguda. Além disso, por meio da PCR quantitativa, é possível identificar a viremia no paciente e acompanhar a evolução do quadro clínico com o tratamento aplicado.

Em relação ao caso apresentado e discutido, percebe-se que situações, como a do felino abandonado, podem ser evitadas quando percebemos a importância de um teste confirmatório antes de tomar qualquer atitude referente aos cuidados dos animais. Sendo assim, a PCR em tempo real padronizada para FeLV se mostrou muito eficaz.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BROWN, M.A; CUNNINGHAM, M.W.; ROCA, A.L.; TROYER, J.L.; JOHNSON, W.E.; O'BRIEN, S.J. Genetic characterization of feline leukemia virus from Florida panthers. **Emerging Infectious Diseases**, n.14, v.2, p.252-9, 2008.

HARTMANN, K. Feline leukemia virus infection. In: GREENE, C.E **Infectious disease of the dog and cat** 3.ed. Georgia: Elsevier, 2006. Cap.13, p.105-131.

KUBISTA M, ANDRADE JM, BENGTSSON MA, FOROOTAN A, JONÁK J, LIND K, et al. The real-time polymerase chain reaction. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, p. 95–125, 2006.

PATRINOS, G. P., DANIELSON, P. B., ANSORJE, W. J. **Chapter 1 – Molecular Diagnostics: Past, Present and Future**. Editor(s): George P. Patrinos. Molecular Diagnostics (Third Edition). Academic Press. p. 1-11, 2017.

ROJKO, J.L. et al. Pathogenesis of experimental feline leukemia virus infection. **Journal of the National Cancer Institute**, v.63, p.759-768, 1979.

YANG, S.; ROTHMAN, R. E. PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations, and future applications in acute-care settings. PubMed, p. 337-48, 2004.