

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
DISCIPLINA DE METODOLOGIA APLICADA A CONCLUSÃO DE CURSO

Avaliação da concordância dos resultados da técnica de PCR e da técnica de imunodifusão rápida para o diagnóstico do vírus da imunodeficiência felina (FIV) e da leucemia felina (FeLV) em amostras de sangue de gatos atendidos no Setor de Medicina Felina do HCV/ UFRGS

Juliana Bisol

PORTO ALEGRE

2016/1

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
DISCIPLINA DE METODOLOGIA APLICADA A CONCLUSÃO DE CURSO

Avaliação da concordância dos resultados da técnica de PCR e da técnica de imunodifusão rápida para o diagnóstico do vírus da imunodeficiência felina (FIV) e da leucemia felina (FeLV) em amostras de sangue de gatos atendidos no Setor de Medicina Felina do HCV/ UFRGS

Autora: Juliana Bisol

Monografia apresentada à
Faculdade de Medicina Veterinária
como requisito parcial para obtenção
da Graduação em Medicina
Veterinária

Orientador (a): Fernanda V.
Amorim da Costa

Co-orientador (a): Stella Faria do Valle

PORTO ALEGRE

2016/1

RESUMO

A detecção acurada das doenças infecciosas de felinos causadas pelo FIV (vírus da imunodeficiência felina) e pelo FeLV (vírus da leucemia felina), é uma necessidade marcante no atendimento clínico desses animais. Atualmente, é preconizado que o exame seja realizado em todos os animais que chegam ao consultório para o primeiro atendimento, para que, a partir do resultado, o protocolo vacinal seja pensado de maneira personalizada e as indicações de cuidados específicos passadas aos tutores corretamente. Conta-se, na rotina clínica, com os exames baseados em imunoenaios enzimáticos diretos e indiretos (ELISA); e a nível acadêmico, dispõe-se de metodologias como *Western blot*, imunofluorescência indireta (IFI), reação em cadeia de polimerase (PCR) e isolamento viral. O presente trabalho tem o objetivo de comparar os resultados dos exames de FIV e FeLV obtidos através de imunoensaio ELISA realizados no LACVet/UFRGS e PCR realizados no Laboratório de Virologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS)/UFRGS dos mesmos pacientes. O estudo revelou 29,26% de soropositividade para FeLV e 24,39% para FIV nos testes baseados em imunoenaios enzimáticos superando as prevalências encontradas ao utilizar a técnica de PCR, que foram de 3,38% para FIV e 9,60% para FeLV. Comparando os resultados podemos observar uma diferença importante que deve motivar um estudo comparativo mais amplo e aprofundado para que seja possível determinar a concordância real entre os dois métodos, possivelmente comparando-os aos métodos de diagnóstico considerados padrão ouro para cada vírus.

Palavras-Chave: felinos, vírus, doenças infecciosas, microbiologia, diagnóstico

ABSTRACT

The accurate detection of infectious cat diseases, FIV and FeLV, is a great need in the clinical care of these animals. Currently, it is recommended to test all felines that seek medical attention for the first time, so that the immunization protocol is designed in a personalized manner and the specific care instructions passed to the tutors as correctly as possible. The retroviral status of all cats should be known due to the serious health consequences of infection that influence patient management both in illness and wellness care. Routine diagnostic screening relies on snap tests that uses direct and indirect enzymatic immunoassays (ELISA). In academic level, methodologies such as Western Blot, Indirect Immunofluorescence (IIF), Polymerase Chain Reaction (PCR) and Virus Isolation are available. This study aims to compare the results of FIV and FeLV status obtained by ELISA immunoassay performed in LacVet / UFRGS and PCR from the same patients. The study revealed 29.26 % of seropositivity for FeLV and 24.39 % for FIV which exceeds the prevalence found with the PCR technique (3.38 % for IVF and 9.60% for FeLV). Comparing the results is possible to see an important difference that should motivate a larger study possibly comparing them to the diagnostic methods considered gold standard for each virus in order to determine the actual agreement between the two methods.

Keywords: *feline, infectious diseases, microbiology, viruses diagnostic*

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resultados obtidos nos testes rápidos Elisa (IDEXX) e resultados obtidos pela técnica de PCR para a detecção pró-vírus de FeLV e FIV realizados no Laboratório de Virologia da UFRGS entre setembro e dezembro de 2014.....10

Tabela 2. Relação das amostras utilizadas no estudo de acordo com a numeração estabelecida pelo LacVet e resultado nos testes de PCR e ELISA 25

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente à minha família, que sempre esteve ao meu lado e foi fonte inesgotável de suporte emocional nos momentos em que precisei.

Aos meus pais, agradeço pela retidão de caráter, ensinada com tanta doçura e carinho ao longo da minha vida. Não existe melhor maneira de aprender as lições da vida do que as ouvindo de vocês. Vocês são a minha fonte inesgotável de sabedoria e amor.

Aos meus irmãos, agradeço o apoio e amizade incondicional. É sempre reconfortante saber que tenho vocês na minha vida independentemente dos nossos caminhos divergentes.

Ao Leo, meu companheiro de vida, agradeço pelo dia-a-dia de amor, companheirismo e, até mesmo, pelos desentendimentos. Discutir meus planos contigo me traz perspectiva e tranquilidade.

Às minhas amigas, que são as irmãs que eu tive o privilégio de escolher, agradeço por uma vida quase inteira de compreensão e incentivo. Não sei se eu teria coragem de enfrentar os desafios com tanta força se não pudesse contar com o apoio amoroso de vocês.

Às amigas que a faculdade me trouxe, agradeço pelo convívio diário nos últimos 5 anos. A presença de vocês tornou esse curso pesado uma jornada mais leve.

Agradeço, também, à Professora Stella do Valle, minha co-orientadora, pelo auxílio na busca dos dados quando eu achei que não os encontrava por culpa minha.

Agradeço à minha orientadora, Professora Fernanda Amorim, pela correção atenciosa e rígida, e pelo conhecimento compartilhado.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	8
2	DESENVOLVIMENTO	10
2.1	Revisão bibliográfica.....	10
2.1	Leucemia viral Felina	10
2.1.2	Vírus da Imunodeficiência Felina.....	14
2.2	 Materiais e métodos	17
2.3	 Resultados	18
2.4	 Discussão	19
3	 CONCLUSÃO	22
	REFERÊNCIAS	23
	ANEXO I.....	27

1 INTRODUÇÃO

A clínica médica de felinos vem ganhando grande destaque no mercado de atuação do médico veterinário. Esse fato é atribuído ao aumento do número de felinos nos domicílios e também à crescente exigência de conhecimentos específicos que os tutores desses animais exigem dos profissionais da área, que devem, portanto, buscar especialização e aprimoramento em medicina de felinos. É nesse cenário que se apresentam, com grande importância clínica e populacional, as doenças infectocontagiosas de felinos causadas pelo FIV (vírus da imunodeficiência felina) e pelo FeLV (vírus da leucemia felina).

Animais não domiciliados, semi-domiciliados ou domiciliados com acesso à rua possuem maiores taxas de infecção (LEVY, 2005). Devido à alta representatividade dessas doenças na população de felinos e da influência na expectativa e qualidade de vida de vida dos animais, as mais recentes diretrizes sobre retrovíroses felinas (LEVY, 2005) recomendam que todo felino atendido em um serviço de saúde veterinária seja testado para FIV e FeLV durante a consulta. O mesmo documento deixa claro 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 torne-se 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.

Existem diferentes metodologias capazes de detectar os patógenos em questão: imunoenaios enzimáticos (ELISA) tradicionais, *kits* rápido de ELISA (testes rápidos), *Western blot*, imunofluorescência indireta (IFI), reação em cadeia da polimerase (PCR) e isolamento viral (ADAM e DANDRIEUX, 2011). Entretanto, apenas os ensaios imunoenzimáticos, até o momento, são oferecidos em formato de *kit* rápido no Brasil, atendendo a necessidade de resultados prontamente disponíveis. Diagnósticos baseados apenas em exames clínicos são altamente ineficazes segundo Richards (2003), visto que o vírus pode estar presente sem ainda ter causado nenhum sinal clínico.

O *kit* rápido de ELISA é amplamente utilizado na prática do médico veterinário para detecção de anticorpos, no caso da FIV, e do antígeno, no caso da FeLV devido a sua praticidade. Segundo o laboratório que confecciona o teste e alguns estudos acadêmicos (SAND *et al.*, 2010; GRUFFYDD-JONES, 2006) esses testes apresentam

elevadas sensibilidade e especificidade: 98,6% e 98,2% para FeLV e 93,5% e 100% para FIV, respectivamente. As demais técnicas (Western blot, PCR e IFI) são utilizadas principalmente em ensaios acadêmicos devido ao tempo, materiais específicos e técnicos treinados necessários para a sua realização.

O presente trabalho objetivou realizar um estudo retrospectivo sobre os resultados dos testes rápidos ELISA de FIV e FeLV disponíveis no banco de dados do LacVet/UFRGS e comparar os resultados obtidos com a avaliação das mesmas amostras no Laboratório de Virologia da UFRGS com a metodologia de PCR, buscando verificar se os exames obtiveram resultados semelhantes.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Leucemia Viral Felina

A Leucemia viral felina (FeLV) é uma doença infecciosa de felinos domésticos e selvagens causada por um *Gammaretrovirus* RNA de fita simples da família *retroviridae*, subfamília *oncoviridae*. Segundo Jarret (1999), o vírus da FeLV foi o primeiro retrovírus felino descoberto em 1964, enquanto investigava a causa de ocorrência de grupos de indivíduos com linfomas em casas com múltiplos gatos na Escócia.

Gatos machos jovens, entre um e seis anos, com acesso à rua compõem, principalmente, o grupo de risco para a infecção. Fernandes (2015) cita um risco 22,9 vezes maior de soropositividade em felinos de até três anos. Felinos oriundos de gatis e residências com alta densidade populacional (mais de três felinos) também pertencem ao grupo de risco. A principal via horizontal de infecção é o contato prolongado com a saliva e secreções nasais de gatos infectados, através da auto-higienização, lambedura mútua e o compartilhamento de fontes de água e comida. A transmissão vertical transplacentária, por lactação e por via venérea são menos importantes (NELSON e COUTO, 2010).

O vírus está distribuído mundialmente e a soroprevalência varia de acordo com a região e a população analisada. Em estudo de Levy *et al* (2006), a prevalência da antigenemia de gatos da América do Norte foi de 2,3 % e, no Japão de 2,9% (FROMONT, PONTIER e LANGLAIS, 2003).

Assim como todos os retrovírus, a replicação no hospedeiro depende da produção da enzima transcriptase reversa que faz a inserção de uma fita de RNA viral no genoma do hospedeiro, resultando na formação de um DNA pró-viral que irá se integrar o DNA da célula e garantir a sua manutenção. Nas divisões subsequentes das células do hospedeiro, o pró-vírus serve como molde para a formação de novas partículas virais que são liberados através da membrana celular por brotamento (NELSON e COUTO, 2010). O genoma viral é constituídos pelo genes *gag*, *pol* e *env*. (TOMONAGA *et al.*, 1992). O gene *gag* é o antígeno específico que codifica as proteínas do nucleocapsídeo *p15e*, *p12*, *p10* e *p27* (JARRET, 1999). A proteína *p27* tem função diagnóstica, pois é a proteína identificada nos testes ELISA e é encontrada nas células infectadas, sangue periférico, lágrimas, saliva e secreções. O gene *pol* codifica a enzima transcriptase reversa e o gene *env* codifica as proteínas de envelope

(TOMONAGA *et al.*, 1992). A glicoproteína de envelope 70 (*gp70*) contém os antígenos dos subgrupos A, B, ou C que são associados a infectividade, virulência e doença causadas por diferentes linhagens dos vírus, e a proteína do envelope p15e induz à imunossupressão (NELSON e COUTO, 2010).

A infecção por FeLV tem distribuição mundial. A soroprevalência da infecção varia geograficamente e depende da população de gatos testados. No Brasil, há registros de 12% de prevalência no Distrito Federal (MARTINS, 2012), 0,78% em São Paulo (SANTOS, 2013), e 12,59% em Uberlândia, Minas Gerais (BARBOSA, 2001), entre outros.

O vírus se replica inicialmente na orofaringe e a infecção pode ter quatro desfechos: infecção abortiva, infecção regressiva, infecção progressiva e infecção focal ou atípica (WILLETT e HOSIE, 2013). A definição sobre qual tipo de infecção será estabelecida no organismo se dá de acordo com o *status* imunológico do felino e a resposta ao vírus. Felizmente, o contato com o vírus não garante a infecção e a infecção não garante a viremia persistente ou a doença (NORSWORTHY, 2009). Evidências sugerem que a interação entre o hospedeiro e o vírus nas primeiras quatro semanas após a exposição pode resultar em falha do sistema imune do hospedeiro em conter a replicação viral nos linfonodos, epitélio, e células precursoras de medula óssea ou em resposta imune bem sucedida resultando em abortamento da replicação viral (TORRES, MATHIASON e HOOVER, 2005).

A infecção abortiva ocorre em gatos cujo sistema imunológico competente é capaz de evitar a replicação viral através de uma resposta efetiva humoral e celular. Desta forma, na infecção abortiva não ocorre a primeira viremia. Os felinos capazes de abortar a infecção nesse estágio possuem altos níveis de anticorpos neutralizantes, e não é possível detectar nem antígeno viral ou RNA viral ou pró-vírus no sangue periférico desses animais, (TOMONAGA *et al.*, 1992). Esse estágio é encontrado em uma parcela muito pequena dos felinos infetados pelo vírus.

A infecção regressiva ocorre quando o vírus consegue replicar no hospedeiro e estabelecer a primeira viremia mas, por vezes, antes mesmo de alcançar a medula óssea, o sistema imune é capaz de debelar a infecção, restringindo o vírus à forma de pró-vírus. Inicialmente, células mononucleadas infectadas disseminam a infecção e, nesse momento, os testes diagnósticos são capazes de detectar o vírus e o felino é transmissor. A fase virêmica, entretanto, dura poucas semanas a meses. Após essa fase, mesmo que o organismo hospedeiro consiga conter a infecção, cópias do pró-vírus permanecem nas

células precursoras da medula óssea. Assim, o felino será diagnosticado como negativo para a presença do vírus nos testes diagnósticos que utilizam sangue periférico, mas é considerado positivo pela permanência do pró-vírus na medula. Essa fase é conhecida por “infecção latente”. Nesse estágio, o pró-vírus fica restrito à medula óssea e não é perceptível aos testes que utilizam sangue periférico para diagnóstico, entretanto, testes baseados em reação de cadeia da polimerase de células de medula óssea serão capazes de detectar o agente.

A infecção progressiva é o quadro mais grave da leucemia viral felina, no qual há viremia e desenvolvimento de doenças associadas à infecção. O sistema imune do animal não é capaz de conter a replicação viral, e ocorre a disseminação do vírus aos tecidos linfóides, medula óssea, mucosas e glândulas (MORGADO *et al.*, 2000). Os testes diagnósticos serão persistentemente positivos nesse tipo de infecção. Felinos que são acometidos pela infecção progressiva têm expectativa de vida limitada a alguns anos.

Enquanto aproximadamente 30% dos animais que tiveram contato com o vírus desenvolvem infecção progressiva e doenças relacionadas ao FeLV, ao menos duas vezes esse número de animais (aproximadamente 60%) desenvolvem infecção regressiva (TORRES, MATHIASON e HOOVER, 2005).

A infecção focal é caracterizada pela replicação do vírus exclusivamente em tecidos específicos, tais como glândula mamária, bexiga ou olhos. É possível que haja uma pequena ou intermitente produção de antígenos fazendo com que os felinos com a infecção abortiva possam ter resultados fracamente positivos ou discordantes nos testes diagnósticos (MORGADO *et al.*, 2000).

Cattori *et al.* (2008) relatam que ao desafiar 11 gatos SPF (livres de patógenos específicos) com FeLV-A via intraperitoneal, o resultado obtido foi: cinco gatos persistentemente infectados e seis gatos com infecção regressiva, sendo um felino com infecção transitória e cinco animais que nunca desenvolveram viremia detectável.

Uma característica importante das retrovirose é a persistência no hospedeiro, que é alcançada por dois mecanismos: integrando ao DNA do hospedeiro uma cópia do DNA viral (originado no RNA viral a partir da enzima transcriptase reversa) e evadindo das respostas imunes focadas nos vírus. A evasão pode ser alcançada por diversas vias, tais como a latência, como na infecção regressiva, a persistência em uma associação extrema com as células dos hospedeiros imunocompetentes, e a indução de um estado

de “inércia” ou imunotolerância aos antígenos virais, que permite a manutenção do vírus sem obstáculos no hospedeiro (JARRET, 1999).

As manifestações clínicas da infecção pelo vírus variam de acordo com o local de inserção do pró-vírus no DNA da célula hospedeira e da recombinação genética resultante, podendo ser classificado em, ao menos, quatro subgrupos: A, B, C (FROMONT, PONTIER e LANGLAIS, 2003) e T (DUNHAM e GRAHAM, 2008). O FeLV-A é a forma transmissível, responsável por hemólise, neoplasias hematopoiéticas e considerado menos patogênico que os outros subgrupos. O FeLV-B é resultado da recombinação na região do gene *env in vivo* do FeLV- A e é responsável por linfomas, leucemias e mielodisplasias em um período relativamente curto. Já o FeLV-C acontece através de mutações em qualquer gene do FeLV-A e se caracteriza por promover anemia aplásica arregenerativa (FROMONT, PONTIER e LANGLAIS, 2003).

Em relação ao diagnóstico, existem inúmeros métodos aptos a serem utilizados para identificar o vírus. FROMONT, PONTIER e LANGLAIS (2003) referem que em gatos virêmicos, os antígenos virais são abundantes no sangue, entretanto a quantidade de anticorpos específicos contra FeLV é muito pequena. Por isso, o FeLV é normalmente detectados por ensaios comerciais baseados em ELISA com detecção de antígenos. Na prática veterinária, o ELISA normalmente é utilizado em sua forma de teste rápido, devido à sua praticidade, custo baixo, ótimos índices de sensibilidade (98,6%) e especificidade (98,2%), além da presença de controles positivo e negativo. Ainda assim, o ensaio diagnóstico padrão ouro para confirmação da leucemia viral felina permanece sendo o isolamento viral. O vírus também pode ser detectado por ensaios utilizando técnicas de *Western Blot*, PCR e imunofluorescência indireta (IFI).

De acordo com Levy *et al* (2005), devem ser testados animais doentes mesmo que possuam resultado negativo no passado, filhotes ou adultos antes de serem adotados (adquiridos ou adotados), felinos que tem acesso à rua ou convivem com animais positivos, após incidentes envolvendo brigas/mordeduras, antes de iniciar o protocolo vacinal e felinos doadores de sangue ou tecidos. Não há restrição de idade para a realização dos testes, visto que as principais metodologias utilizadas baseiam-se na detecção do antígeno, não sofrendo, dessa forma, influência dos anticorpos maternos. Há, entretanto, a necessidade de respeitar um período de 30 dias após o possível contágio para diminuir o risco de um resultado falso negativo. A vacinação não interfere no resultado.

2.2 Vírus da Imunodeficiência Felina (FIV)

O vírus da imunodeficiência felina, assim como do vírus da FeLV, é um retrovírus RNA fita simples, mas pertence à subfamília *Lentiviridae*. A primeira descrição da doença foi em 1987 em um gatil onde muitos felinos apresentavam doenças relacionadas ao estado de imunodeficiência (PEDERSEN, 1987 *apud* MAGDEN *et al.*, 2013).

Desde então, muito se tem estudado sobre o vírus, em parte, devido a sua similaridade com o HIV, visto que ele é morfológicamente similar ao vírus humano, mas antigenicamente distinto (NELSON e COUTO, 2010). O FIV tem sido utilizado em modelos experimentais para se extrapolar dados para o vírus humano e para se providenciar qualidade de vida aos felinos soropositivos.

A principal via de transmissão entre os felinos é a mordedura, sendo a transmissão vertical (via útero, intraparto, leite/colostró) incomum (LITSTER, 2014). Estudos multifatoriais revelaram que idade, sexo, *status* imunológico e estilo de vida tem associação positiva significativa com a soropositividade (RAVI, 2010). Felinos machos, de acordo com Fernandes (2015), têm um risco de contágio 2,8 vezes maior que fêmeas nas mesmas situações.

Embora a mordida de um animal contaminado quase sempre garanta o contágio, a taxa de progressão da doença é variável e refere que muitos felinos não apresentam nenhuma evidência de imunossupressão durante toda vida e morrerão por causas não relacionadas à FIV, enquanto que outros progredirão rapidamente e apresentarão sinais graves da doença (KANN *et al.*, 2014).

O estabelecimento da patologia segue um padrão típico observado nos lentivírus de primatas, que começa com um período relativamente curto (semanas) de fase aguda caracterizado pelo aumento da carga viral, episódios de pirexia, perda de peso, linfadenopatia e neutropenia. Muitos desses sintomas iniciais desaparecem ao longo da evolução para a fase latente, que é caracterizada por uma resposta imune antiviral relativamente forte, baixo título viral, declínio gradual de células CD4+ e sinais clínicos sutis que pode durar muitos anos (HARTMANN, 2012).

A fase terminal da infecção é marcada pela descompensação imunológica (síndrome da imunodeficiência adquirida ou SIDA), exacerbação da carga viral plasmática e sintomas clínicos das infecções causadas pelas infecções secundárias

(GRANT *et al.*, 2009). Via de regra, apenas 10% dos animais chegam a essa fase e são necessários vários anos para ela seja atingida.

Felinos naturalmente infetados pelo vírus podem apresentar sinais clínicos de febre, desordens hematopoiéticas, dermatite, otite, linfadenopatia, estomatite, gengivite, doenças neurológicas, doenças oculares, perda de peso, letargia, anorexia, emaciação, cistite, nefrite, diarreia, abscessos, insuficiência/falência renal, doenças de pele, doenças hepáticas e infecções de trato respiratório superior (BARSANTI *et al.*, 1996; RAVI, 2010). Os sinais clínicos normalmente são consequência de infecções oportunistas, neoplasias e/ou mielossupressão que são comuns ao longo do desenvolvimento da doença. Hartmann (2012) observou que, enquanto os felinos infectados por FeLV tem 62 vezes mais chance de desenvolverem linfomas ou leucemia por ação direta do vírus quando comparados com os animais soronegativos, os felinos infectados por FIV tem um risco cinco vezes maior de desenvolvimento de tumores pela ação normalmente indireta do vírus.

A imunossupressão característica da doença é resultado da alteração progressiva dos tecidos linfóides com depleção tímica, hiperplasia linfoide, plasmocitose e finalmente depleção linfoide (GRANT *et al.*, 2009). Essas alterações são responsáveis pela diminuição de células CD4+ e linfócitos T no sangue periférico (RAVI, 2010). Há também alteração da função dos macrófagos e mudanças no perfil de citocinas (BARR *et al.*, 2000). Essas ações se devem à interação do vírus com receptores específicos celulares e, de acordo com Dunham e Graham (2008), pode-se afirmar que em relação aos receptores celulares, assim como o vírus da imunodeficiência humana, o vírus da FIV necessita de receptores primários e secundários. O receptor primário é o CD134, que é expressado nos linfócitos T CD4+, nos linfócitos B e macrófagos ativados. O receptor secundário é o CXCR4, um receptor de quimiocitocina, que é análogo ao utilizado pelo vírus HIV.

O vírus possui alto grau de diversidade genética e até o momento foi possível caracterizar 6 subtipos de FIV de acordo com características moleculares dos genes *env* ou *gag* (NAKAMURA *et al.*, 2000). Embora a importância clínica da identificação dos subtipos ainda seja desconhecida (LITTLE, 2005), a distribuição dos subgrupos já foi pesquisada. Dunham e Graham (2008) citam a presença do subgrupo A no norte dos Estados Unidos e região oeste da Europa, enquanto o subtipo B predomina no sul da Europa e região leste do território Norte-americano. Os subtipos F e U foram os mais recentemente descobertos, nomeadamente nos Estados Unidos e Nova Zelândia

(FERNANDES, 2015) Cita-se também a existência de variáveis recombinantes (LITTLE, 2005) No Brasil, através de técnica de sequenciamento genômico, Silva *et al* (2014) encontraram apenas o subtipo B em todas as amostras analisadas provenientes do estado do Rio Grande do Sul. Os mesmos autores referem que estudos realizados em São Paulo, Minas Gerais e Rio de Janeiro também identificaram apenas o subtipo B.

O vírus tem distribuição mundial e a prevalência varia entre 2% em Taiwan a 24% na Austrália (LITTLE, 2005). No Japão, encontra-se a maior prevalência registrada, com 28,9% dos gatos afetados (NAKAMURA *et al.*, 2000). Nos Estados Unidos, foi encontrada prevalência de 4,7% avaliando felinos doentes e provenientes de grupos de risco (LITTLE, 2005) e no Brasil, Silva *et al* (2014) referem prevalência de 15,7%.

A American Association of Feline Practitioners (AAFP) recomenda que todos os felinos sejam testados para retrovíroses em determinados momentos, tais como: ao serem adquiridos ou adotados, ao serem expostos a um gato sabidamente infectado e previamente ao início do protocolo vacinal. Felinos doentes devem ser testados mesmo se já forem possuidores de resultado negativo no passado e após incidentes envolvendo mordedura. Animais com acesso à rua ou pertencentes a grupos de risco devem ser testados anualmente.

Em relação ao diagnóstico, deve-se levar em consideração que, devido aos altos títulos de anticorpos anti-FIV séricos, grande parte das técnicas diagnósticas baseiam-se na detecção de anticorpos, ao contrário do que ocorre com a leucemia viral. O ensaio imunoenzimático realizado na forma teste rápido, assim como no FeLV, é a metodologia mais acessível aos médicos veterinários e conta com ótimos índices de sensibilidade (93,5%) e especificidade (100%), além de custo razoável. Para a imunodeficiência felina, o teste padrão ouro é o Western Blot, mas também podem ser realizados PCR e isolamento viral, geralmente para exames confirmatórios.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Inicialmente, teve-se acesso aos resultados de 177 amostras de sangue periférico de animais atendidos no Hospital de Clínicas Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul testadas com a técnica de PCR no Laboratório de Virologia do ICBS/UFRGS, entre setembro e dezembro de 2014. A tabela contendo a compilação dos resultados obtidos na pesquisa de PCR encontra-se no Anexo I.

Posteriormente, buscou-se identificar os animais testados pelos números de referência e buscar os resultados de testes rápidos ELISA (IDEXX[®]) realizados nos mesmos pacientes no Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias (LacVet) da UFRGS.

Os resultados de PCR e ELISA que correspondiam ao mesmo paciente foram então comparados e tabelados para verificar a frequência de concordância ou discordância entre eles.

4 RESULTADOS

Dos 177 resultados encontrados dos testes de PCR realizados no Laboratório de Virologia, apenas 41 tinham sido também testados pelo teste rápido ELISA no LacVet (Tabela 1). Dos 41 resultados encontrados, 12 foram positivos para FeLV (29,26%), 10 foram positivos para FIV (24,39%), e 5 foram negativos para ambas doenças.

Considerando a totalidade (177) dos resultados obtidos com a técnica de PCR, pode-se observar na Tabela 1, 6 amostras positivas para FIV e 17 para FeLV perfazendo um total 3,38% e 9,60% de positividade respectivamente.

Entre os 12 resultados positivos para FeLV no ELISA, 10 amostras não foram positivas na PCR. Da mesma forma, 8 testes rápidos positivos para FIV não tiveram resultados positivos na PCR. Ao contrário, apenas um dos resultados positivos para FeLV na PCR não foi positivo no teste rápido ELISA.

Tabela 1. Resultados obtidos nos testes rápidos Elisa (IDEXX) para a detecção de antígenos de FeLV e anticorpos de FIV realizados no LacVet/UFRGS entre setembro e dezembro de 2014 e resultados obtidos pela técnica de PCR para a detecção pró-vírus de FeLV e FIV realizados no Laboratório de Virologia da UFRGS entre setembro e dezembro de 2014.

	PCR		ELISA	
	Positivos		Positivos	
	Absoluto	Percentual %	Absoluto	Percentual %
FIV	6	3,38	10	24,39
FELV	17	9,6	12	29,26
TOTAL	177		41	

5 DISCUSSÃO

Na época em que as amostras de sangue foram buscadas no LacVet para realizar a técnica de PCR, buscava-se padronizar uma técnica de PCR em tempo real no Laboratório de Virologia da UFRGS para diagnóstico de FIV e FeLV, portanto, todas as amostras disponíveis e armazenadas de forma adequada foram testadas. Provavelmente, por isso apenas 41 das 177 testadas pela PCR tenham sido testadas também no LacVet com o teste rápido ELISA, pois normalmente este exame só é realizado em amostras de sangue de pacientes com suspeita clínica.

Ainda que não tenha sido possível comparar a maioria das amostras, já foi possível perceber uma diferença importante entre a frequência de positividade nos resultados ao utilizar a técnica de PCR e a técnica de ELISA. Há diversos aspectos a serem considerados para podermos contextualizar o resultado da pesquisa.

Segundo Norsworthy *et al* (2010), a técnica mais comum de triagem diagnóstica é o ensaio enzimático rápido que se baseia na detecção do antígeno *p27* no sangue periférico. Essa técnica caracteriza-se pela sua alta sensibilidade, (98,6%) que indica que a probabilidade da técnica não reconhecer um resultado positivo é extremamente pequena. Existe, no entanto, uma pequena chance, de 1,8%, de ocorrência de falsos positivos, que acontecem quando um animal negativo tem um resultado positivo no teste. Por esse motivo, o ELISA rápido é indicado majoritariamente como teste de triagem e Gruffydd-Jones (2009) reforça essa afirmação quando refere que “resultados negativos no *snap test* são geralmente confiáveis, entretanto resultados falso positivos podem ocorrer, principalmente quando se testa felinos com baixa probabilidade de infecção. Entretanto, tratando-se de uma situação onde a probabilidade de infecção é alta, tal qual é o caso dos felinos que buscam atendimento no HCV/UFRGS, a importância da possibilidade um resultado falso positivo torna-se pequena. Ainda assim, quando restam dúvidas sobre a confiabilidade do resultado do teste utilizado, recomenda-se que seja realizada uma retestagem utilizando outra técnica diagnóstica. Entre os testes recomendados para a confirmação, pode-se citar o Western Blot para FIV e isolamento viral para FeLV, ou PCR para ambas. A recomendação de confirmação é ainda mais importante quando o resultado positivo origina-se de gatos considerados de baixo risco e assintomáticos. No caso desta pesquisa, os animais foram testados em situação de possível doença, visto que estavam buscando atendimento em um serviço de medicina veterinária, o que diminui a chance de ocorrência de um falso positivo na técnica. Desta forma, poderíamos considerar que se a PCR foi realizada

como teste confirmatório, então dos 12 casos positivos no teste rápido, somente as duas amostras positivas na PCR seriam verdadeiramente positivas. No entanto, a alta prevalência já demonstrada para a região e o fato de a técnica do PCR utilizada no estudo ainda estar em desenvolvimento e sujeita a aprimoramentos, torna essa possibilidade improvável

Quando o teste tem uma baixa sensibilidade, temos possibilidade de obter um resultado falso negativo, isto é, há falha em detectar um resultado positivo. Embora esse resultado não seja frequente nos ensaios enzimáticos ELISA pela alta sensibilidade do método, existe uma pequena chance de obtermos um resultado falso negativo que pode ser explicado pelos diferentes desfechos que a infecção pelo vírus da FeLV assume no felino, como é o caso das infecções regressivas e focais. Nesses desfechos, passada a primeira viremia, não tem-se antígeno circulante no sangue periférico, e dessa forma, tem-se um felino infectado, mas que aparecerá negativo nos testes que baseiam-se na detecção de antígenos séricos. Nesses casos, a técnica de PCR é a mais adequada para identificar a infecção, pois vai detectar o ácido nucléico viral ao invés dos antígenos virais. Entre 5% e 10% dos gatos que testaram negativo para antígeno mostraram-se positivos pelo PCR segundo Levy *et al* (2005) que também referem que a PCR pode ser capaz de reconhecer um felino infectado antes da detecção do antígeno pelo ensaio enzimático. Esse pode ser o caso da única amostra que testou negativo para FeLV no teste rápido e positivo na PCR .

Segundo Norsworthy e colaboradores (2010), também na infecção causada pela imunodeficiência, existe uma pequena possibilidade de falsos negativos, visto que há um grupo de animais que pode ter uma incapacidade de produzir um nível detectável de anticorpos anti-FIV, seja por fatores imunológicos particulares, seja por características clássicas do estágio final da doença. O autor reforça que, 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.

Há também alguns detalhes de execução importantes que podem promover um resultado errôneo do teste rápido. São eles: utilizar os kits em temperatura inadequada, ler o resultado no tempo incorreto e usar sangue total para a realização do teste (HARTMANN *et al.*, 2007). Devido ao trabalho tratar-se de um estudo retrospectivo de dados, não é possível sugerir se alguns desses detalhes podem ser implicados na divergência de resultados.

É importante observar a prevalência encontrada na PCR, que foi de 3,38% para FIV e 9,60% para o FeLV, e compará-la com resultados similares. Um estudo recente que buscou padronizar uma reação em cadeia da polimerase para identificação dos vírus, conduzido por Finoketti (2011) utilizando 77 amostras do HCV/UFRGS, revelou 34% de amostras positivas para FIV e 30% para FeLV. Da mesma forma, ao comparar-se o resultado da PCR com inquéritos soropidemiológicos realizados, também tem-se resultados similares: a prevalência encontrada nos estudos sorológicos é frequentemente mais elevada. Algumas possibilidades podem ser levantadas para explicar essas diferenças: animais em estágios iniciais de infecção nos quais já há viremia, mas o genoma viral ainda não foi integrado ao genoma da célula hospedeira podem ser positivos ao ELISA mas negativos na PCR (ARJONA *et al*, 2007, apud Pedersen *et al* 1989, Innis *et al* 1990, Barr 1996). Há a possibilidade também de serem falso negativos na PCR devido a cargas virais abaixo do limite inferior de detecção da técnica ou *primers* incapazes de reconhecer diferentes subtipos de FIV ou variantes de FeLV.

6 CONCLUSÃO

O estudo permitiu observar a existência de uma diferença importante entre a frequência de resultados positivos no PCR e no teste rápido ELISA. No entanto, devido ao pequeno número de testes rápidos realizados nas mesmas amostras testadas por PCR, não foi possível traçar um comparativo adequado e que possibilitasse a realização de uma análise estatística de significância. É necessário um estudo comparativo mais amplo e aprofundado para que seja possível determinar a concordância real entre os dois métodos, possivelmente comparando-os aos métodos de diagnóstico considerados padrão ouro para cada vírus.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAM, F.; DANDRIEUX, J. Diagnostic testing for detection of feline retroviruses. **In Practice**, v. 33, p. 498–506, 2011.

ARJONA, Alvaro et al. Evaluation of a novel nested PCR for the routine diagnosis of feline leukemia virus (FeLV) and feline immunodeficiency virus (FIV). **Journal Of Feline Medicine & Surgery**, v. 9, n. 1, p.14-22, 2007.

BARBOSA, Fernando Cristino; CHRISTIANINE, Maria Paula de Tullio; WALDEMARIN, Kátia Cristina Andrade. Prevalência de Leucemia Felina em Gatos Domésticos de Uberlândia- MG. **Arquivo de Ciências Veterinárias e Zoologia**, v. 5, n. 2, p.207-211, 2001.

BARR, Margaret C *et al.* Exogenous glucocorticoids alter parameters of early feline immunodeficiency virus infection. **The Journal of Infectious Disease**, v. 181, p. 576-586, 2000

BARSANTI, Jeanne A., *et al.* Relationship of lower urinary tract signs to seropositivity for feline immunodeficiency virus in cats. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 10, n.1, p. 34-38, 1996

CATTORI, Valentino *et al.* Real-time PCR investigation of feline leukemia virus proviral and viral RNA loads in leukocyte subsets. **Veterinary Immunology And Immunopathology**, v. 123, n. 1-2, p.124-128, 2008.

DUNHAM, Stephen P.; GRAHAM, Elizabeth. Retroviral Infections of Small Animals. **The Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 38, n. 4, p.879-901, 2008.

FERNANDES, Ana Patrícia Rocha Pimenta. **Prevalência do Vírus da Imunodeficiência Felina (FIV) e do Vírus da Leucemia Felina (FeLV) e Fatores de Risco associados à seropositividade em gatos domésticos do Distrito de Lisboa**. 2015. 82 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Medicina Veterinária, Universidade de Trás-os-montes e Alto Douro, Lisboa, 2015.

FINOKETTI, Fernando. **Ocorrência dos vírus da imunodeficiência felina (FIV) e leucemia felina (FeLV) em felinos no município de Porto Alegre**. 2011. 37 f. TCC (Graduação) - Curso de Biomedicina, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Ufrgs, Porto Alegre, 2011. Disponível em: <<http://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/142816>>. Acesso em: 09 julho. 2016.

FROMONT, Emmanuelle; PONTIER, Dominique; LANGLAIS, Michel. Disease propagation in connected host populations with density-dependent dynamics: the case of the Feline Leukemia Virus. **Journal Of Theoretical Biology**, v. 223, n. 4, p.465-475, 2003.

JARRET, Oswald; Strategies of retrovirus survival in the cat. **Veterinary Microbiology**, v. 69, p. 99-107, 1999.

GRUFFYD-JONES, Tim. 4TH WORLD SMALL ANIMAL VETERINARY CONGRESS 2009, 2009, São Paulo. **Proceedings of the 34th World Small Animal Veterinary Congress WSAVA 2009**. São Paulo: Ivis, 2009. 5 p. Disponível em: <www.ivis.org>. Acesso em: 27 de maio de 2016.

GRANT, C. K. et al. Improved health and survival of FIV-infected cats is associated with the presence of autoantibodies to the primary receptor, CD134. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, v. 106, n. 47, p.19980-19985, 2009.

GRUFFYDD-JONES, T., FeLV and FIV: How to Make a Reliable Diagnosis. *In: British Small Animal Veterinary Congress*, 2006 Disponível em:

HARTMANN, Katrin. Clinical Aspects of Feline Retroviruses: A Review. **Viruses**, v. 4, n. 12, p.2684-2710, 2012.

KANN, Rebecca K.C et all. Association between feline immunodeficiency vírus (FIV) plasma viral RNA load, concentrarion of acute phase proteins and disease severity. **The Veterinary Journal**, v. 201, p. 181-183, 2014.

LAPPIN, M.R, Oportunistic infections associated with retroviral infections in cats. **Seminars in Veterinary Medicine and Surgery**, v. 10, n. 4, p. 244-250, 1995.

LEVY, J. *et al*, 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.10, 2005.

LITTLE, Susan E. Feline immunodeficiency vírus testing in stray, feral, and cliente-owned cats of Ottawa. **Canadian Veterinary Journal**, v. 46, p. 898-901, 2005

MAGDEN, E. *et al*, Acute virulent infection with feline immunodeficiency vírus (FIV) results in limphomagenesis via an indirect mechanism. **Virology**, v. 436, p. 284-294, 2013.

LITSTER, Annete L. Transmission of feline immunodeficiency vírus (FIV) among cohabiting cats in two cat rescue shelters. **The Veterinary Journal**, v. 201, p. 184-188, 2014.

MAGDEN, Elizabeth et al. Acute virulent infection with feline immunodeficiency vírus (FIV) results in lymphomagenesis via an indirect mechanism. **Virology**, v. 436, n. 2, p. 284-294, 2013.

MARTINS, Giovana da Silva Martins *et al*, Prevalência de imunodeficiência viral felina e leucemia viral felina no Distrito Federal.. **Archives of Veterinary Science** , v. 17 n. 1, p274-276, 2012.

MORGADO, Mariza; BARCELLOS, Christovam; PINA, Maria de Fátima; BASTOS, Francisco Inácio. Human Immunodeficiency Virus/Acquired Immunodeficiency Syndrome and tropical diseases: a brazilian perspective. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, p. 145-151, 2000.

NAKAMURA, Yuki et al. An updated nation-wide epidemiological survey of feline immunodeficiency virus (FIV) infection in Japan. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v.72, n. 8, p. 1051-1056, 2000.

NELSON, Richard. W., COUTO, C.Guillermo. **Medicina Interna de Pequenos Animais**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.1084, 2010

NORSWORTHY, Gary et al. **PRACTITIONER'S UPDATE: FELINE RETROVIRUS DISEASE**. Ontario: Animal Health Publishing., v. 1, n. 1, jun. 2010.

NORSWORTHY, G. D.et al. O Paciente Felino. 2ed. São Paulo: Ed. Manole, p. 801, 2004.

RAVI, Madhu *et al.* Naturally acquired feline immunodeficiency virus (FIV) infection in cats from western Canada: prevalence, disease associations, and survival analysis. **Canadian Veterinary Journal**, v 51, p. 271-276, 2010

RICHARDS, J. Retrovirus Testing: The Mainstay Remains. **Journal Of Feline Medicine & Surgery**, SAGE Publications. v. 5, n. 1, p.1-2, 2003.

SAND, C., *et al.* Evaluation of a new in-clinic test system to detect feline immunodeficiency virus and feline leukemia virus infection. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 39, n. 2, p. 210–214, 2010.

SANTOS, Denise Langanke dos; LUCAS, Ronaldo; LALLO, Maria Anete. Epidemiologia da imunodeficiência viral, leucemia viral e peritonite infecciosa em felinos procedentes de um Hospital Veterinário. **Academica**, v. 11, n. 497, p.161-168, 17 abr. 2013. Disponível em: <http://www2.pucpr.br/reol/index.php/academica?dd1=12651&dd2=6615&dd3=pt_BR&dd99=pdf>. Acesso em: 09 de julho 2016.

SILVA, F.s. *et al.* Ocorrência do subtipo B do vírus da imunodeficiência felina em gatos domésticos da região sul do estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 66, n. 1, p.1-6, 2014.

TOMONAGA, Keizo; NORIMINE, Junzo; SHIN, Yeon-Sil *et al* . Identification of a feline immunodeficiency virus gene which is essential for cell-free virus infectivity. **Journal of Virology**, v. 66, n. 10, p. 6181-6185, 1992.

TORRES, Andrea N.; MATHIASON, Candace K.; HOOVER, Edward A. Re-examination of feline leukemia virus: host relationships using real-time PCR. **Virology**, v. 332, n. 1, p.272-283, 2005.

WILLETT, Brian J.; HOSIE, Margaret J.. Feline leukaemia virus: Half a century since its discovery. **The Veterinary Journal**,v.195, n. 1, p.16-23, 2013.

ANEXO I

Identificação das amostras e resultados do PCR e ELISA

Identificação da amostra	PCR		<i>Snap test ELISA</i>	
	FIV	FelV	FIV	FelV
14722	-	-	NE	NE
14771	-	-	-	+
14703	-	-	-	+
14727	-	-	NE	NE
14691	-	-	NE	NE
14688	-	-	+	-
14701	-	-	-	-
14695	-	-	-	-
14692	-	-	+	+
14699	-	-	-	-
14707	-	-	-	-
14750	-	-	-	-
14772	-	-	NE	NE
14698	-	-	NE	NE
14721	-	-	NE	NE
14654	-	-	NE	NE
14585	-	-	NE	NE
14657	-	-	-	-
14586	-	-	-	-
14680	-	-	NE	NE
14666	-	-	-	+
14591	-	-	NE	NE
14609	-	-	NE	NE
14597	-	-	NE	NE
14603	-	-	NE	NE
14601	-	-	-	+
14627	-	-	NE	NE
14574	-	-	NE	NE
14602	-	-	NE	NE
14659	-	-	NE	NE
14944	-	-	NE	NE
14959	-	-	NE	NE
14940	-	-	NE	NE
14952	-	-	NE	NE
14825	-	-	NE	NE
14964	-	-	NE	NE
14928	-	-	NE	NE
14975	-	-	-	-
14844	-	-	-	+
14934	-	-	NE	NE

14418	-	-	NE	NE
14994	-	-	NE	NE
14793	-	-	-	-
14891	-	-	NE	NE
14908	-	-	-	-
14924	-	-	-	-
14796	-	-	NE	NE
14831	-	-	NE	NE
14930	-	-	NE	NE
14837	-	-	NE	NE
14798	+	-	NE	NE
14910	-	-	NE	NE
14976	-	-	NE	NE
14906	-	-	NE	NE
14832	-	-	NE	NE
14787	-	-	NE	NE
14791	-	-	NE	NE
14876	-	-	NE	NE
14827	-	-	NE	NE
14873	-	-	NE	NE
14777	-	+	-	+
14870	-	-	NE	NE
14872	-	+	NE	NE
14925	-	+	-	+
14855	+	+	+	+
14917	-	-	NE	NE
14841	-	-	NE	NE
14893	-	-	-	-
14898	-	-	NE	NE
14826	-	-	NE	NE
15043	-	-	NE	NE
15058	-	-	NE	NE
15103	-	-	NE	NE
15079	-	-	NE	NE
15049	-	-	NE	NE
15105	-	-	NE	NE
15155	-	-	NE	NE
15166	-	-	NE	NE
15120	-	-	NE	NE
15035	-	-	-	-
15052	-	-	NE	NE
15062	-	-	NE	NE
15088	-	-	NE	NE
15102	-	-	NE	NE
15030	-	-	-	-

15132	-	-	NE	NE
15147	-	+	NE	NE
15150	+	-	NE	NE
15171	-	-	NE	NE
15172	-	-	NE	NE
15187	-	-	NE	NE
15033	-	-	NE	NE
15173	-	-	NE	NE
15148	-	+	NE	NE
15133	-	-	NE	NE
15004	-	-	NE	NE
15006	-	+	-	+
15030	-	+	-	-
15009	-	-	NE	NE
15004	-	+	NE	NE
15055	-	-	NE	NE
15027	-	-	NE	NE
15011	-	-	+	-
15381	-	+	NE	NE
15382	-	-	NE	NE
15393	-	-	NE	NE
15405	-	-	NE	NE
15371	+	-	+	+
15234	-	-	NE	NE
15302	-	-	NE	NE
15256	-	-	-	+
15339	-	+	NE	NE
15227	-	-	NE	NE
15304	-	-	NE	NE
15263	-	-	NE	NE
15318	-	-	NE	NE
15236	-	-	NE	NE
15284	-	-	NE	NE
15295	-	-	-	-
15255	-	-	-	-
15285	-	-	NE	NE
15246	-	-	NE	NE
15306	-	-	NE	NE
15329	-	-	NE	NE
15226	-	-	NE	NE
15267	-	-	NE	NE
15338	-	-	NE	NE
15265	-	-	NE	NE
15559	-	-	NE	NE
15596	-	-	NE	NE

15561	-	+	NE	NE
15606	-	-	NE	NE
15534	-	-	-	+
15610	+	-	+	-
15537	-	-	NE	NE
15572	-	-	-	-
15533	-	-	NE	NE
15576	+	-	NE	NE
15432	-	-	NE	NE
15471	-	-	NE	NE
15469	-	-	-	-
15590	-	-	NE	NE
15601	-	-	+	-
15610	-	-	+	+
15525	-	-	NE	NE
15509	-	-	NE	NE
15428	-	-	NE	NE
1538/15440	-	-	NE	NE
1539/15440	-	-	NE	NE
15542	-	-	+	-
15528	-	-	NE	NE
15622	-	-	NE	NE
15628	-	-	-	-
15435	-	-	NE	NE
15440	-	-	NE	NE
?	-	-	NE	NE
15783	-	-	NE	NE
15699	-	-	NE	NE
15629	-	-	NE	NE
15784	-	-	NE	NE
15650	-	-	NE	NE
15787	-	-	NE	NE
15788	-	+	NE	NE
15722	-	-	NE	NE
15669	-	-	NE	NE
15670	-	-	NE	NE
15660	-	+	NE	NE
15761	-	-	NE	NE
15765	-	+	NE	NE
15785	-	-	-	-
15782	-	-	+	-
15760	-	-	NE	NE
15666	-	-	NE	NE
15786	-	-	NE	NE
15830	-	+	NE	NE

15789	-	-	+	-
15832	-	+	-	+

+: Positivo

-: Negativo

NE: Resultado não encontrado