
APLICAÇÃO DE UM TESTE ELISA INDIRETO NO DIAGNÓSTICO DA CINOMOSE EM AMOSTRAS DE SORO CANINO, MARSUPIAS E PRIMATAS

APPLICATION OF AN INDIRECT ELISA TEST IN DIAGNOSIS OF CANINE DISTEMPER VIRUS, MARSUPIA AND PRIMATES SERUM SAMPLES

Bruno Passos FERNANDES¹; Robson Bahia CERQUEIRA²

1 - Graduando em Medicina Veterinária pela Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.

2 - Professor Doutor na Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.

RESUMO:

A cinomose é uma enfermidade causada pelo vírus Vírus da Cinomose Canina (VCC). Essa doença afeta principalmente cães, mas também acomete outras espécies domésticas (como felinos e bovinos) e selvagens (como primatas e marsupiais). O grau e intensidade que esse patógeno vai atingir o organismo do indivíduo está relacionado à imunidade do animal. Ela afeta a respiração do animal, pode causar vômito, diarreia, convulsões, podendo levar o animal à óbito. O objetivo do presente trabalho foi aplicar um teste ELISA indireto em amostras de soro de cães, marsupiais e primatas para diagnóstico da cinomose canina e análise do funcionamento do gradiente de cor nas placas testadas. O teste foi aplicado em 45 amostras sorológicas de populações de cães do bairro de Inocop da cidade de Cruz das Almas - Bahia, no qual se observou 12 amostras com positividade. Amostras de um banco de soro canino dos bairros de Tabela e Inocop da cidade de Cruz das Almas - Ba, das 45 amostras testadas, observou-se 16 amostras positivas. Com relação às amostras de soros oriundas dos atendimentos no Hospital universitário de Medicina Veterinária da UFRB que incluem bairros como Suzana, Lauro Passos, Centro, Ana Lucia, Primavera e Assembleia, observaram-se seis amostras positivas. Utilizando 45 amostras de um banco de soro de marsupiais, no qual se observa que 21 amostras apresentaram resultados acima do ponto de corte. Os soros de primatas, obtidos a partir de um banco de soro do Laboratório de Doenças Infecciosas do Hospital Universitário da UFRB também foram submetidos ao ELISA indireto, no qual se observa que quatro amostras apresentaram resultados acima do ponto de corte. Ainda com relação ao banco de soro de primatas, em outra placa com 45 diferentes amostras, observou-se duas amostras apresentaram positividade.

Palavras Chaves: CDV; Enfermidades Infecciosas; Imunodiagnóstico.

ABSTRACT:

Distemper is a disease caused by the Canine Distemper Virus (CDV). This disease mainly affects dogs, but also affects other domestic and wild species. The animal's immunity is related to the degree to which this pathogen will reach the individual's organism. It affects the animal's breathing, can cause vomiting, diarrhea, convulsions, and can lead to death. The objective of the present work was to apply an indirect ELISA test standardized by FERNANDES, 2022 in serum samples from dogs, marsupials and primates for the diagnosis of canine distemper and analysis of the color gradient functioning in the tested plates. The test was applied to 45 serological samples from populations of dogs from the Inocop neighborhood of the city of Cruz das Almas - Bahia, in which 12 samples were positive. Samples from a canine serum bank from the neighborhoods of Table and Inocop of the city

of Cruz das Almas - Ba, of the 45 samples tested, 16 samples were positive. Regarding the samples of sera from consultations at the University Hospital of Veterinary Medicine at UFRB, which include neighborhoods such as Suzana, Lauro Passos, Centro, Ana Lucia, Primavera and Assembly, six positive samples were observed. Using 45 samples from a marsupial serum bank, in which it is observed that 21 samples presented results above the cut-off point. The primate sera, obtained from a serum bank of the Laboratory of Infectious Diseases of the University Hospital of UFRB were also submitted to indirect ELISA, in which four samples presented results above the cut-off point. Still in relation to the primate serum bank, in another plate with 45 different samples, two samples were found to be positive.

Key Word: CDV; Infectious Diseases; Immunodiagnosis.

1. INTRODUÇÃO

A cinomose é uma enfermidade causada pelo vírus *Canine Distemper Virus (CDV)*. Essa doença afeta principalmente cães, mas também acomete outras espécies domésticas (felinos e bovinos) e selvagens (primatas e marsupiais). O grau e intensidade que esse patógeno vai atingir o organismo do indivíduo está relacionado à imunidade do animal. Ela afeta a respiração do animal, pode causar vômito, diarreia, convulsões, podendo levar o animal a óbito. A transmissão do vírus da cinomose se dá através de aerossóis, alimentos, água e fômites contaminados, podendo ser eliminado durante meses no ambiente pelas urinas, fezes, saliva e secreções (Correa *et. al.*, 1991).

O cuidado com a higienização dos ambientes se mostra importante para evitar a proliferação entre os animais domésticos. Freitas-Filho *et. al.*, em 2014, avaliou através de fichas clínicas e exames laboratoriais 246 animais de variadas idades e sexo, destes, 24,80% foram diagnosticados como saudáveis, enquanto 75,20% apresentaram a doença.

Quanto ao sexo, os machos se mostraram menos predispostos à doença que as fêmeas, com respectivamente 42,16% e 57,84% dos animais doentes. Quanto à idade, os animais jovens e adultos se mostraram mais predispostos que animais mais velhos, com respectivamente 57,83%, 28,65% e idosos com 13,52%.

O CDV consegue se replicar em vários tipos de células, porém as células linfóides e os macrófagos se mostram, quando comparada às outras, mais susceptíveis. Quando o vírus infecta essas células, é disseminado para os órgãos linfóides como baço, timo, linfonodos e medula óssea, onde neste, infecta os linfócitos maduros e promove a apoptose e conseqüentemente diminuição da imunidade do animal (BARBOSA *et. al.*, 2011).

O exame clínico é o primeiro a ser realizado, a anamnese, analisando os sinais clínicos e evolução da doença. A PCR é um teste cada vez mais em ascensão devido a sua alta sensibilidade e especificidade para inúmeras enfermidades, esse teste de diagnóstico detecta o RNA viral na amostra testada (Bento *et al.*, 2013), e sua eficácia na fase crônica da doença se mostra melhor. Na fase aguda, o exame de imunofluorescência se mostrou

mais eficaz para diagnosticar a cinomose canina (Greene & Vandeveld, 2015), pois a titulação do antígeno pode interferir no resultado, apresentando maiores quantidades de falsos positivos ou negativos.

O teste ELISA indireto também é utilizado para detectar anticorpos do CDV em amostras de sangue, plasma ou líquido do animal. O mais utilizado para o diagnóstico desta enfermidade é o teste ELISA comercial. A falta de teste de diagnóstico rápido, de baixo custo, sensível e eficaz para essa enfermidade demanda pesquisas na produção de técnicas laboratoriais no sentido de desenvolver métodos mais eficientes e confiáveis para o diagnóstico da doença.

O objetivo do presente trabalho foi aplicar um teste ELISA indireto padronizado por FERNANDES, 2022 em amostras de soro de cães, marsupiais e primatas para diagnóstico da cinomose canina para verificação da funcionalidade do teste nestas espécies e análise do funcionamento do gradiente de cor nas placas testadas para que as placas possam ser lidas à olho nu, sem a utilização de um leitor de microplaca.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Teste ELISA indireto

Os testes aplicados às populações de animais (canídeos, marsupiais e primatas) foi realizado de acordo com Fernandes, 2022, onde a houve a realização do ELISA indireto foram sensibilizadas placas de 96 poços com o antígeno de superfície na diluição de 1:1600 e utilizou-se diluição de 1/100 com tampão carbonato e o antígeno em um tubo de 10 mL (para realização de cada placa). Feito isso, foi levado à geladeira dentro da câmara úmida por cerca de 18 horas. Após esse tempo, utilizamos PBS-T (Sendo 1 litro composto por 50 mL de NaCl, 20 mL de tampão fosfato, 930 mL de água destilada e 500 ul de Tween) e leite em pó desnatado para fazer o bloqueio das placas, com a quantidade de 10 ml e 0,5g respectivamente, no qual foi colocado 100µl/poço da mistura e levado à estufa por 2 horas e meia, sempre dentro da câmara úmida. Após isso levou para estufa, lavou-se 5 vezes os poços utilizando o PBS-T. Dando sequência, realizou-se a diluição de das amostras à serem testadas em 1:200. Foi colocado 100µl da diluição por poço, levando em seguida à estufa 37°C por mais 1 hora dentro da câmara úmida. Após esse período foi feita a lavagem por cinco vezes com PBS-T. Em seguida, colocou-se o conjugado (anti-imunoglobulina total de cão produzida em coelho), 50µl por poço durante 1 hora à estufa. Lavou-se a placa 5

vezes com PBS-T. Em seguida acrescentou-se 50ul a solução reveladora (10ml de ácido cítrico mais 0,00014g de OPD mais 4 µl de água oxigenada (H₂O₂) deixado na bancada durante 30 minutos para a revelação. Após esse tempo, freou-se a placa utilizando ácido sulfúrico e realizou-se a leitura com filtro de 492 nm. que obteve resultados de 95,5% e 84,4% respectivamente, no qual em cada teste, a placa foi sensibilizada com um antígeno de superfície na diluição de 1:1600, posteriormente, deixada na geladeira over-night, por 18 horas em uma câmara úmida. Posteriormente foi lavada duas vezes com PBS-T20, foi realizado o bloqueio da placa, com leite desnatado em pó (molico) diluído em PBS-T20 à 7% e deixada na estufa à 37°C por duas horas. Após esse tempo, A placa foi lavada novamente duas vezes, posteriormente foi distribuído na placa em duplicatas as amostras controle (branco, negativo e positivo) e os soros dos animais das respectivas espécies. A placa foi deixada na estufa à 37°C por uma hora, foi lavada com PBS-T20 cinco vezes, foi distribuído 50 microlitros para colunas ímpares e 100 microlitros para colunas pares do conjugado (imunoglobulina de coelho anti-IgG [molécula inteira - H+L] de cão marcado com peroxidase - Sigma) por poço. A placa foi deixada na estufa à 37°C por uma hora e meia e retirada, lavada por cinco vezes com PBS-T20. Foi adicionada a Solução reveladora (10 ML Ácido cítrico + 60 microlitros H₂O₂ (30 volume) + 60 µg de OPD). A reação foi freada com ácido sulfúrico (H₂SO₄) após média de 30 minutos e lida no espectrofotômetro com filtro de 492 nm.

2.2 Aplicação do teste padronizado em amostras de soro canino e soro de animais silvestres.

Para verificação do desempenho do teste ELISA padronizado, foram submetidas amostras de soro de cães de diferentes bairros de Cruz das Almas-Ba, bem como amostras de soros de marsupiais e primatas que também fazem parte do banco de soro do Laboratório de Doenças Infecciosas da HUMV-UFRB.

2.3 Aplicação do gradiente de coloração nas amostras testadas

Utilizando o gradiente de coloração padronizado por Fernandes, 2022, foi analisado os resultados das amostras testadas no teste ELISA indireto para detecção das amostras positivas e negativas a olho nu, sem utilização de um leitor de microplacas. O gradiente de coloração apresenta os resultados de acordo com a tonalidade de amarelo nos poços,

quanto maior a densidade óptica obtida no leitor de microplaca, a tonalidade dos poços se mostra mais forte, sendo considerado positivo de acordo com o padronizado.

3. RESULTADOS

3.1 Aplicação do teste em amostras de soro canino de diferentes bairros de Cruz das Almas-Ba, marsupiais e primatas

O teste foi aplicado em 45 amostras sorológicas de populações de cães do bairro de Inocop da cidade de Cruz das Almas - Bahia, no qual se observa que 12 amostras apresentaram resultados acima do ponto de corte, com a densidade óptica, oscilando entre 0,253 e 0,657 (FIGURA 1). Avaliando a leitura com o gradiente de cor, verifica-se que as amostras positivas apresentaram coloração equivalente ao padronizado, assim como o gradiente das amostras que deram negativas.

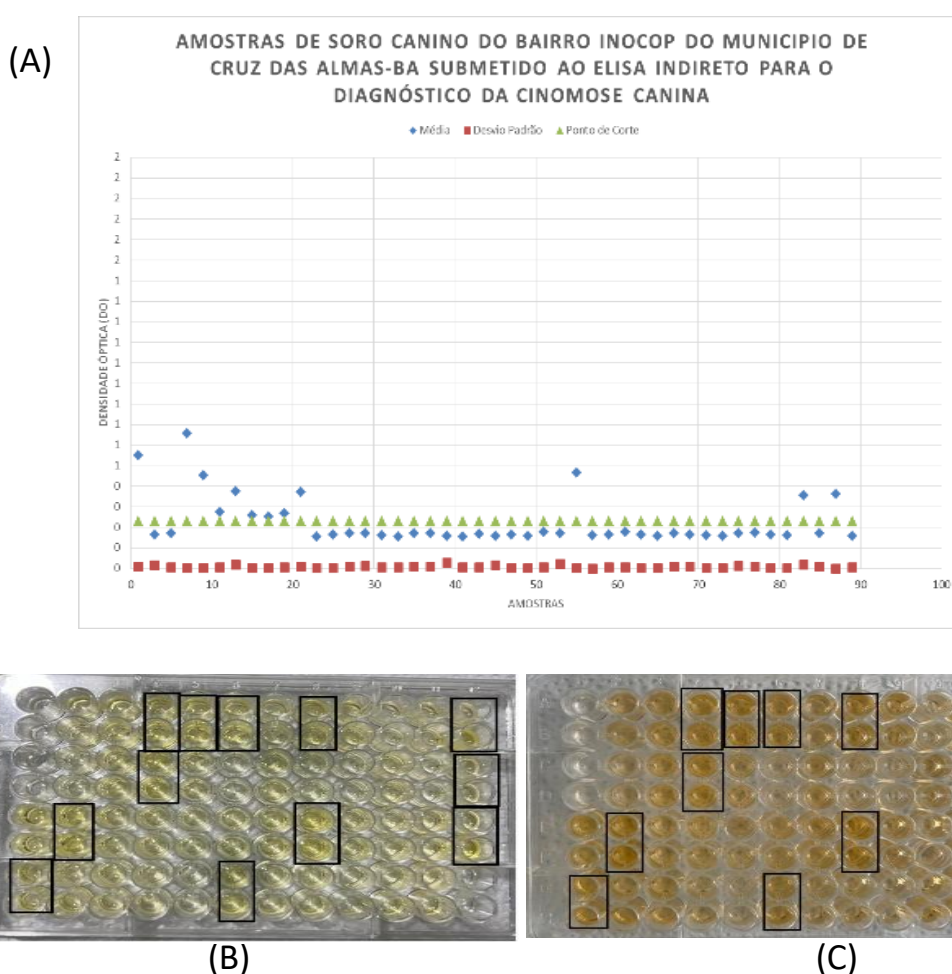


FIGURA 1: (A) Elisa indireto aplicado em amostras de soro canino do bairro Inocop em Cruz das Almas/Ba, (B) – Reação sem frear, (C) – Reação freada

Amostras de um banco de soro canino (45 amostras) dos bairros de Tabela e Inocop da cidade de Cruz das Almas - Ba, observou-se 16 amostras com a densidade óptica acima do ponto de corte do ELISA padronizado com variação de 0,261 a 0,851. Analisando a reação pelo gradiente de cor, também foi observado que os valores corresponderam aos observados na padronização descrita das reações não freada e freada respectivamente (FIGURA 2).

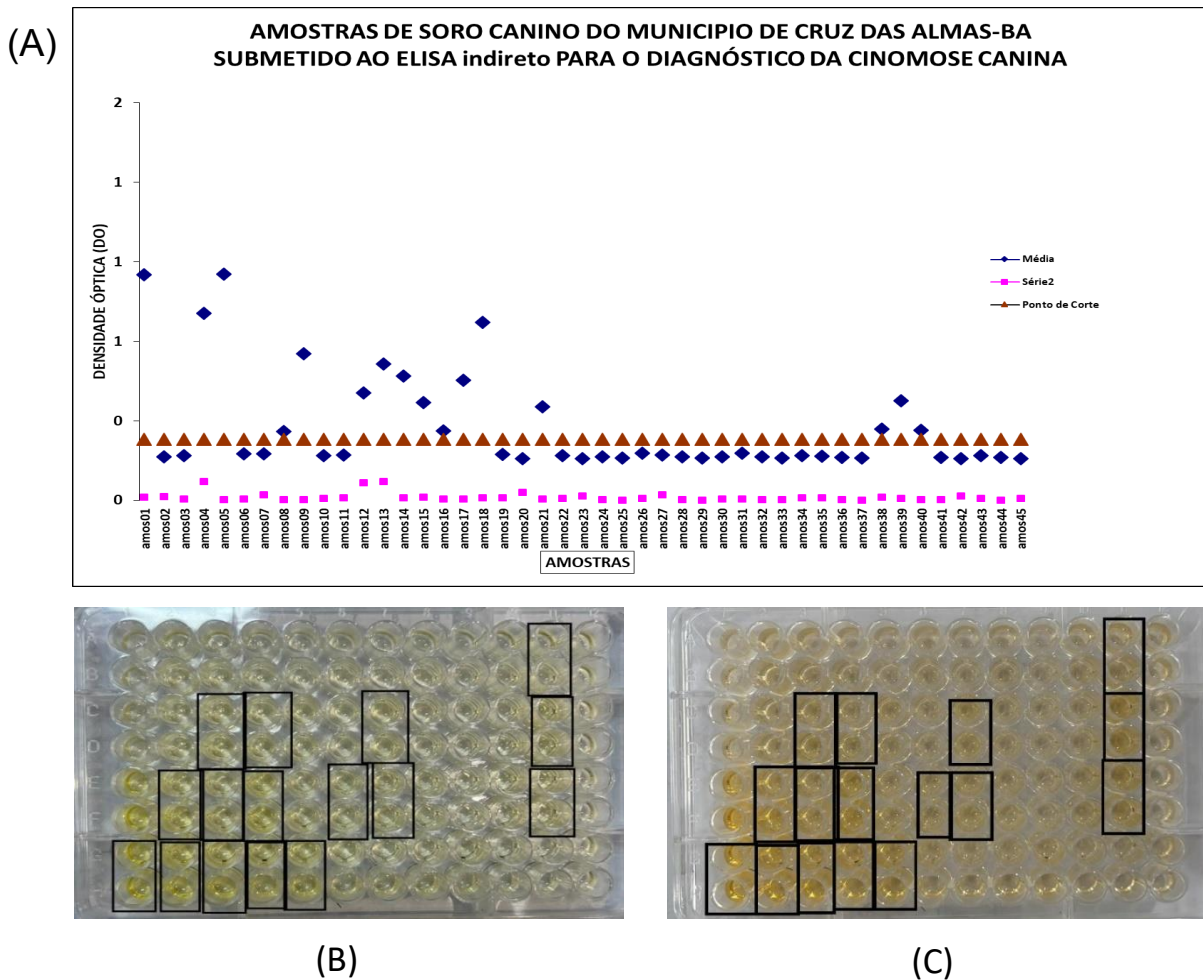


FIGURA 2: (A) Amostras de soro canino de animais da cidade de Cruz das Almas-Ba – Inocop e Tabela submetidos ao teste ELISA indireto para o diagnóstico da cinomose canina, (B) – Reação sem frear, (C) – Reação freada

Com relação às 45 amostras de soros oriundas dos atendimentos no Hospital universitário de Medicina Veterinária da UFRB que incluem bairros como Suzana, Lauro Passos, Centro, Ana Lucia, Primavera e Assembleia, observaram-se seis amostras com a densidade óptica acima do ponto de corte do ELISA padronizado com variação de 0,257 a 0,354. Analisando a reação pelo gradiente de cor, também foi observado que os valores

corresponderam aos observados na padronização descrita das reações não freada e freada respectivamente (FIGURA 3).

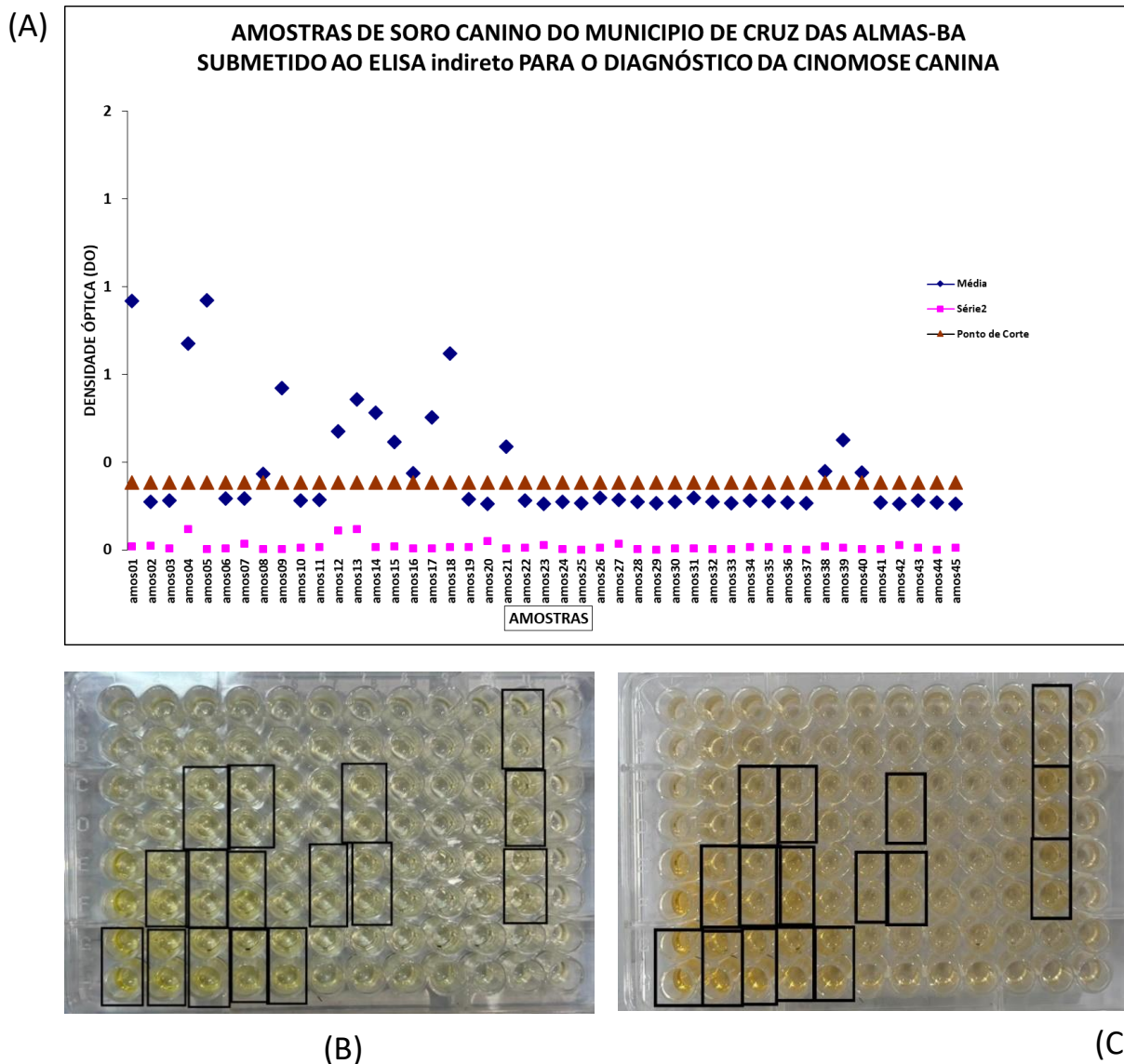
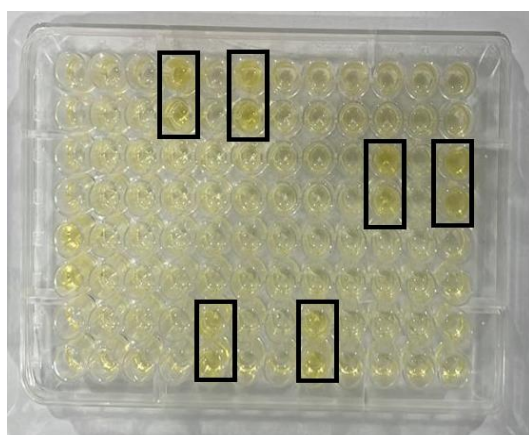
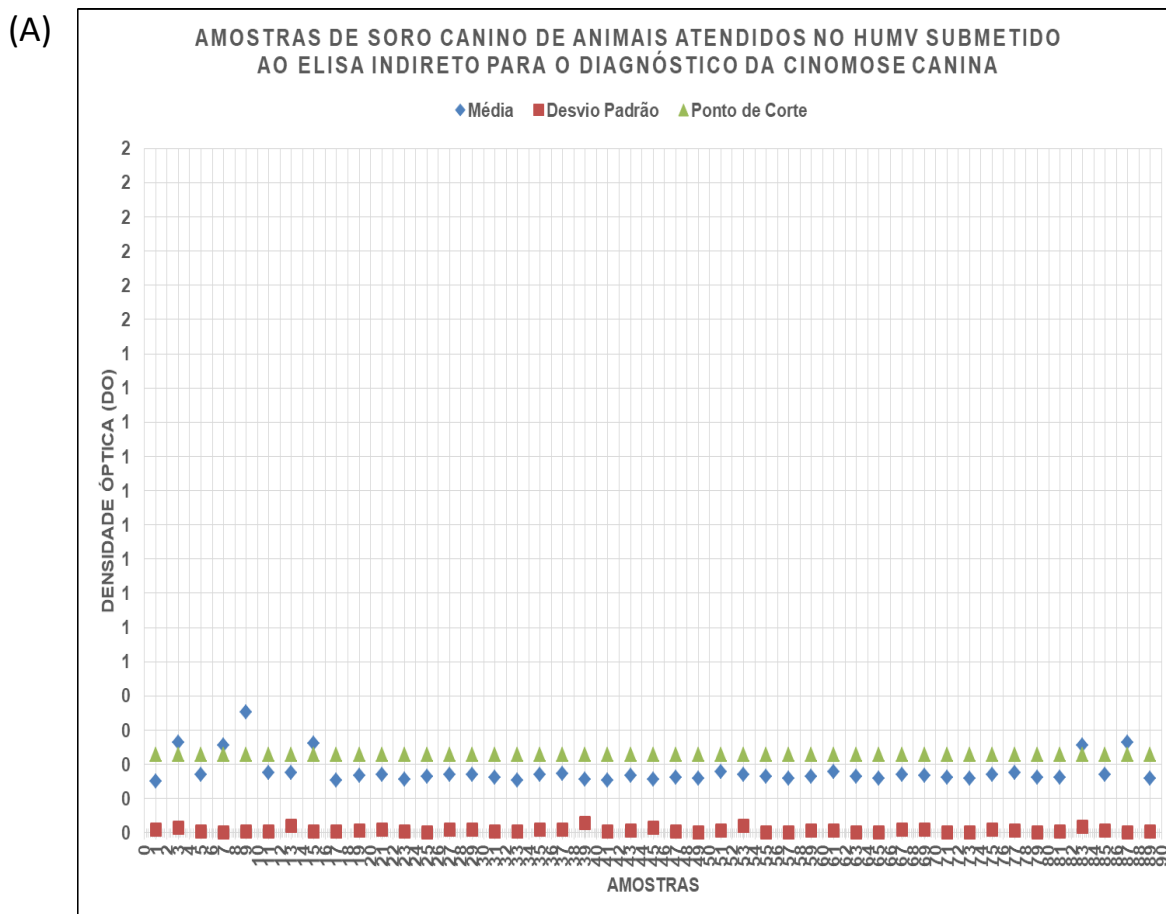


FIGURA 3: (A) Amostras de soro canino de animais da cidade de Cruz das Almas-Ba – Inocop e Tabela submetidos ao teste ELISA indireto para o diagnóstico da cinomose canina, (B) – Reação sem frear, (C) – Reação freada

Foi realizado um teste ELISA indireto utilizando 45 amostras de um banco de soro de marsupiais, no qual se observa que 21 amostras apresentaram resultados acima do ponto de corte, com a densidade óptica, oscilando entre 0,254 e 0,457. Avaliando a leitura com o gradiente de cor, verifica-se que as amostras positivas apresentaram coloração

equivalente ao padronizado, assim como o gradiente das amostras que deram negativas (FIGURA 4).



(B)



(C)

Figura 4: Elisa indireto aplicado em amostras de soro canino do HUMV- UFRB, (B) – Reação sem frear, (C) – Reação freada.

Observou-se também que amostras de cães de uma determinada área do bairro Tabela da cidade de Cruz das Almas - Bahia apresentaram resultados negativos com densidade óptica abaixo do ponto de corte, apresentando toda a placa como negativa. Estes animais fazem parte de condomínios (FIGURA 5).

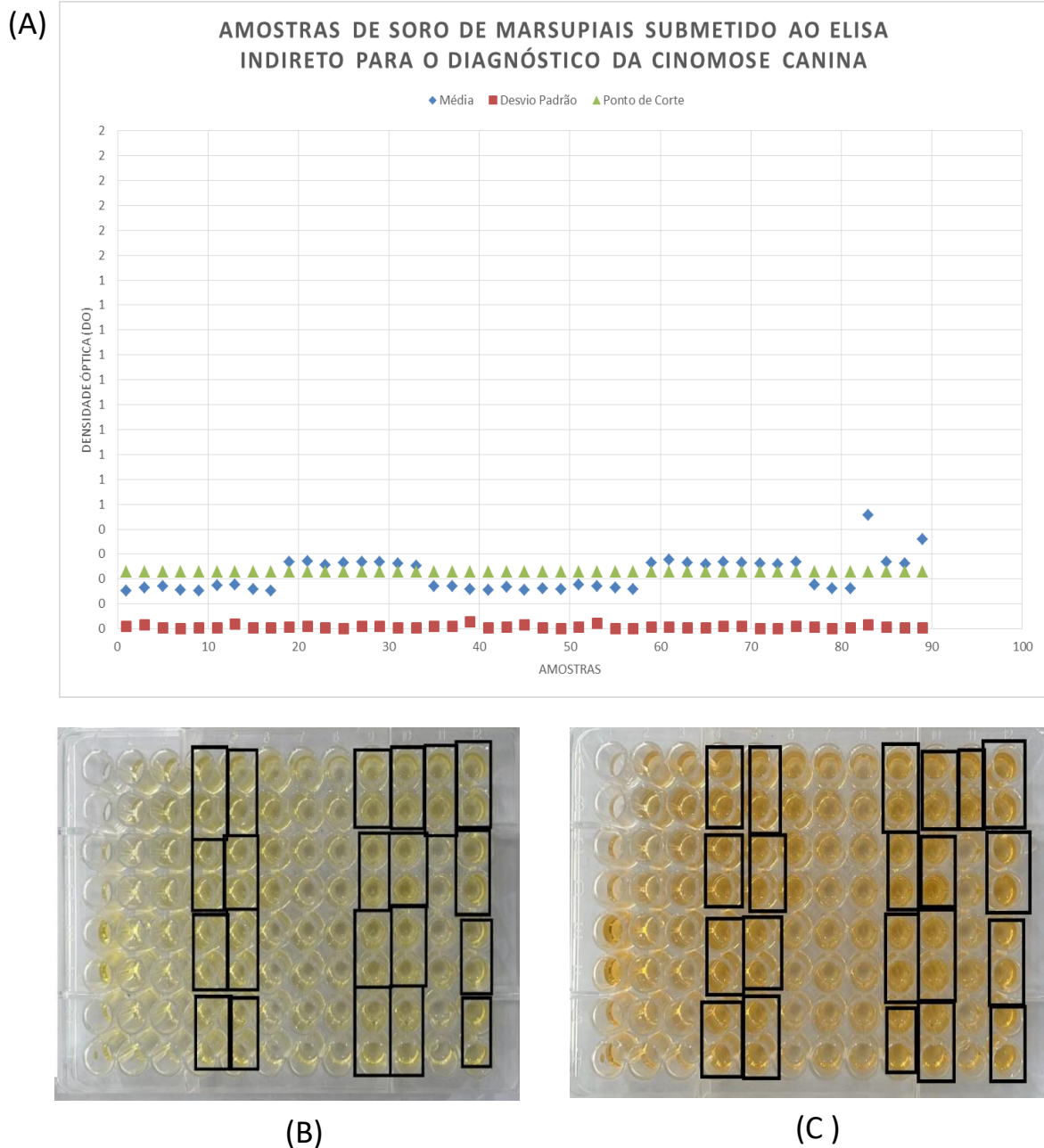
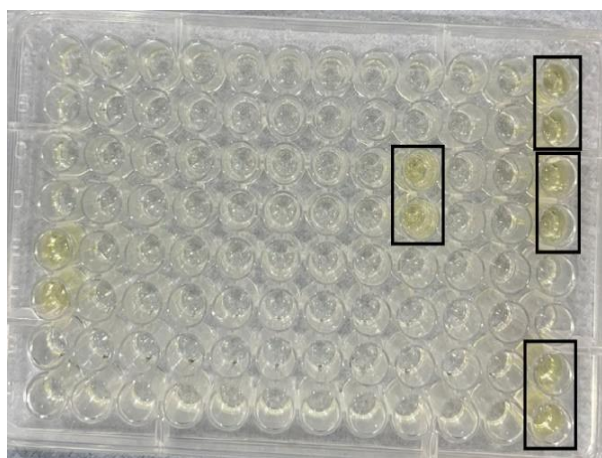
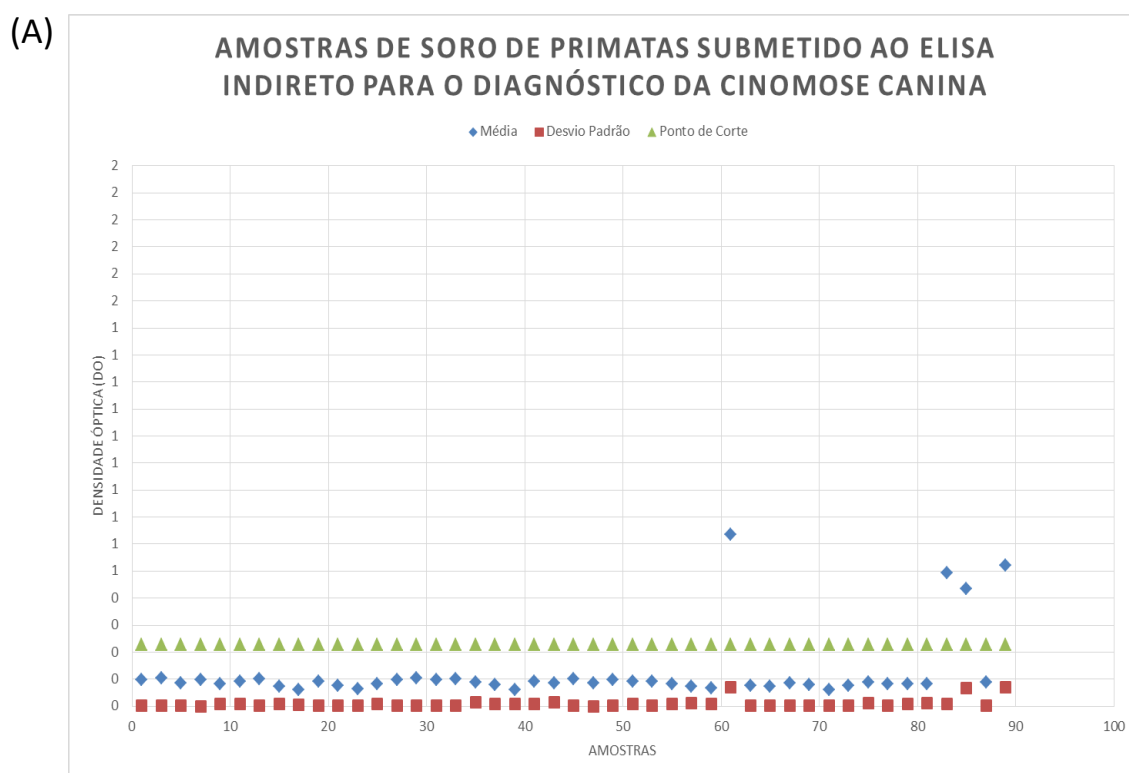
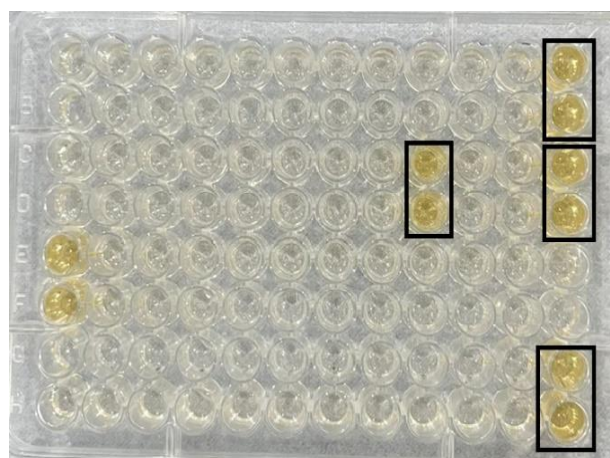


FIGURA 5: Elisa indireto aplicado em amostras de soro canino do HUMV- UFRB, (B) – Reação sem frear, (C) – Reação freada

Os soros de primatas, obtidos a partir de um banco de soro do Laboratório de Doenças Infecciosas do Hospital Universitário da UFRB também foram submetidos ao ELISA indireto, no qual se observa que quatro amostras apresentaram resultados acima do ponto de corte, com a densidade óptica, oscilando entre 0,435 e 0,634. Avaliando a leitura com o gradiente de cor, verifica-se que as amostras positivas apresentaram coloração equivalente ao padronizado, assim como o gradiente das amostras que deram negativas (FIGURA 6).



(B)



(C)

FIGURA 6: (A) Elisa indireto aplicado em amostras de soro de primatas, (B) – Reação sem frear, (C) – Reação freada

Ainda com relação ao banco de soro de primatas, nesta placa observamos duas amostras apresentaram resultados acima do ponto de corte, com a densidade óptica, oscilando entre 0,549 e 0,997. Avaliando a leitura com o gradiente de cor, verifica-se que as amostras positivas apresentaram coloração equivalente ao padronizado, assim como o gradiente das amostras que se apresentaram negativas (FIGURA 7).

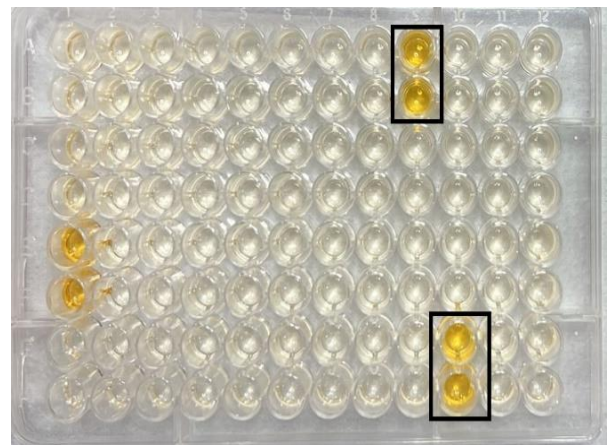
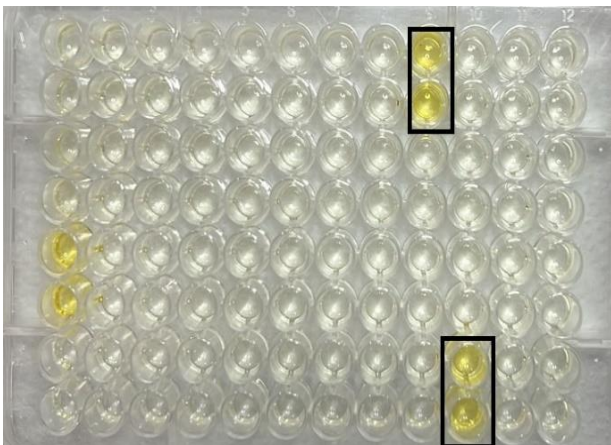
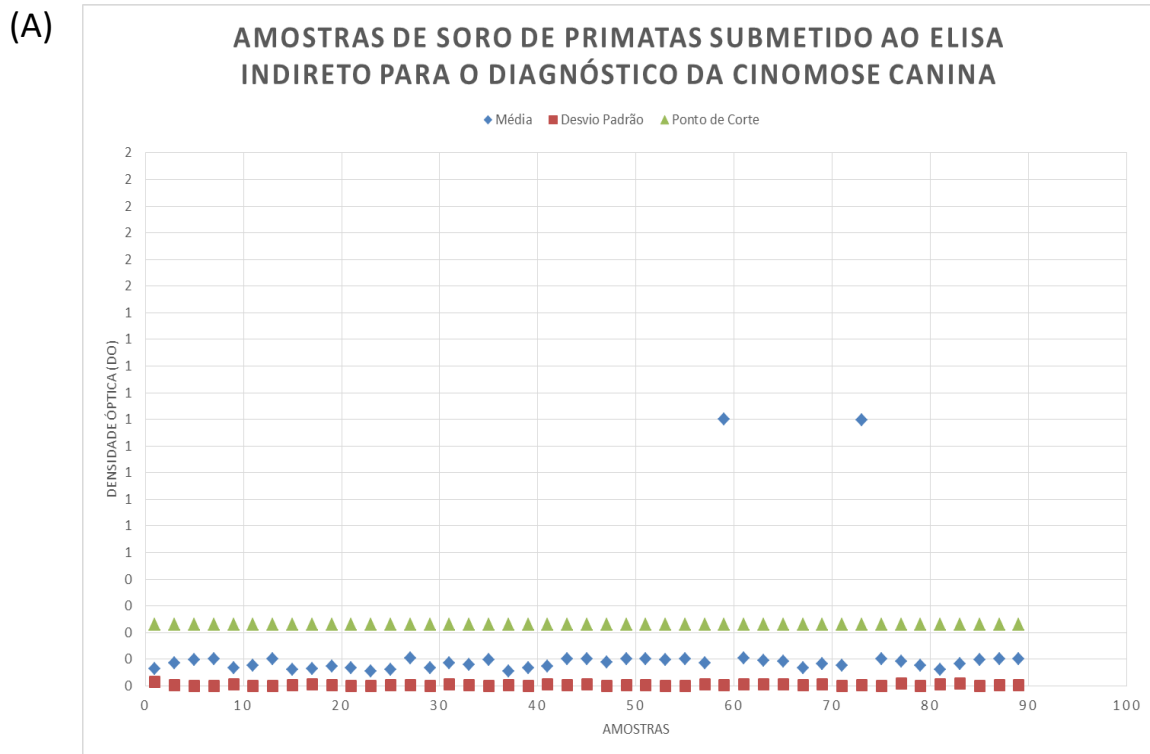


FIGURA 7: (A) Elisa indireto aplicado em amostras de soro de primatas. (B) – Reação sem frear, (C) – Reação freada

4. DISCUSSÃO

São poucos os relatos de CDV em marsupiais, porém, Pain *et. al.*, 1997, propõe que o vírus pode ter desempenhado um papel importante na extinção do lobo da tasmânia (*Thylacinus cynocephalus*), considerado o maior marsupial carnívoro dos tempos modernos, no século 20. Relatos afirmam que a doença também deixou o furão de patas negras norte-americanas (*Mustela nigripes*) à beira da extinção na década 1970. Esses relatos demonstram a potencialidade da doença em acometer diferentes espécies, tornando-as hospedeiros acidentais. As amostras de marsupiais utilizadas no presente trabalho são de sariguês (*Didelphis albiventris*) que possuíam contato com as áreas urbanas e canídeos domésticos, o que pode explicar a grande quantidade de positividade ao teste para a espécie.

Dentre os morbilivírus, o vírus da cinomose afetou uma grande diversidade de espécies de hospedeiros (Alexander *et. al.*, 1995). As ordens primata e artiodactyla são extremamente vulneráveis a infecção natural da doença (Yoshikawa *et. al.*, 1989; Appel *et. al.*, 1991). Fatos estes que é possível observar na presente pesquisa, uma vez que dos 90 soros de primatas, seis ultrapassaram o ponto de corte de densidade óptica, apresentando positividade. Os primatas, cujas amostras sorológicas foram utilizadas, apresentaram consideravelmente baixa positividade, uma vez que os animais possuem contato com a área urbana e cães, esperava-se que os animais apresentassem maior positividade ao teste. Os animais que se apresentaram como positivos, pode ser por reação cruzada com anticorpos para outros agentes etiológicos ou contato com animais ou fômites contaminados.

5. CONCLUSÃO

Conclui-se com o presente trabalho que o teste detectou uma quantidade de positividade em amostras caninas alta nos bairros da cidade de Cruz das Almas – Bahia, fato este que pode se dar por uma série de motivos, como animais vacinados que foram positivos ao teste, animais infectados. Em marsupiais, quase metade das amostras se apresentaram positivos ao teste, os marsupiais eram da região de Cruz das Almas – Bahia, possuíam acesso à rua, podendo se contaminarem com cães ou fômites contaminados, ou pode-se ter reação cruzada no teste com outra enfermidade. Nas amostras de primatas, poucos foram os que apresentaram positividade, provavelmente por não possuírem tanto

acesso à área urbana e cães domésticos e fômites contaminados. Quanto ao gradiente de cor utilizado, foi possível observar a olho nu as amostras consideradas positivas, com a coloração mais intensa, e as amostras negativas, com a coloração menos intensa, variando de acordo com a densidade óptica obtida no teste.

5. REFERÊNCIAS

BARBOSA, Tatiana de Sousa et al. Avaliação laboratorial da cinomose canina: estudo retrospectivo de 25 casos no município de Araçatuba-SP. *Revista de Ciências Agroveterinárias*, p. 113-118, 2011.

Bento, M. S., Chamelete, M. O. & Dantas, W. F. M. (2013). Diagnóstico clínico e histopatológico de neoplasmas cutâneos em cães e gatos atendidos na rotina clínica do hospital veterinário da Univiçosa. *ANAIS SIMPAC*, 5.

BRAZ, Gissandra Farias. Padronização e teste da técnica de imunofluorescência direta para o diagnóstico da cinomose canina. 2009.

CORRÊA, W. M & CORRÊA, C.N.M. Cinomose. *Enfermidades dos animais domésticos*. Invarella. São Paulo, 1991.

FERNANDES, Bruno Passos; CERQUEIRA, Robson Bahia. PADRONIZAÇÃO DE UM TESTE ELISA INDIRETO NO DIAGNÓSTICO DA CINOMOSE EM AMOSTRAS DE SORO CANINO, MARSUPIAS E PRIMATAS. Trabalho de Conclusão de Curso, 2022.

FREITAS-FILHO, Edismauro et al. Prevalência, fatores de risco e associações laboratoriais para Cinomose canina em Jatai-GO. *Enciclopédia Biosfera*, v. 10, n. 18, 2014.

FREY, Andreas; DI CANZIO, James; ZURAKOWSKI, David. A statistically defined endpoint titer determination method for immunoassays. *Journal of immunological methods*, v. 221, n. 1-2, p. 35-41, 1998.

GREENE, C. E.; VANDEVELDE, M. Cinomose. *Doenças infecciosas em cães e gatos*. Guanabara Koogan, 2015.

NOON. K. F. et. al., Enzyme-linked immunosorbent assay for evolution of antibody to canine distemper virus. Am. J. Vet. Res. v. 41, n 4, p. 605-609, 1980.

REGINA, Magda. Produção de antígenos virais para detecção de anticorpos contra o vírus da cinomose canina. 1998.

Autor para correspondência:

Rafael Simões de Souza

Email: rafaelsimoes94@hotmail.com

Centro Universitário Barão de Mauá

Recebido: 11/11/2022 Aceite: 29/11/2022