

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS  
GRUPO DE PESQUISA INFECTOLOGIA E SAÚDE VETERINÁRIA  
GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**BRUNO PASSOS FERNANDES**

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

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA**

**ABRIL – 2022**

**BRUNO PASSOS FERNANDES**

**PADRONIZAÇÃO DE UM TESTE ELISA INDIRETO NO  
DIAGNÓSTICO DA CINMOSE EM AMOSTRAS DE SORO CANINO,  
MARSUPIAS E PRIMATAS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, como requisito parcial para obtenção do grau de Médico Veterinário.

Orientador: Prof. Dr. Robson Bahia Cerqueira

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA**

**ABRIL – 2022**

## FOLHA DE APROVAÇÃO

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

**Bruno Passos Fernandes**

**Orientador:** Prof. Dr. Robson Bahia Cerqueira

Aprovado como parte das exigências para a obtenção do Título de Bacharel em Medicina Veterinária, pela Banca Examinadora:



---

Prof. Dr. Robson Bahia Cerqueira  
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB)  
Orientador



---

Prof. Dr. Alexandre Moraes Pinheiro  
Examinadora 1



Prof. Associada IV  
UFRB-CCAAB-LIAA

---

Prof. Dra. Ludmilla Santana Soares e Barros  
Examinadora 2

Data de Realização: 20 de Julho de 2022

**Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada à fonte.**

## **CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

Como trata-se de banco de soro do Laboratório de Doenças Infecciosas do Hospital Universitário de Medicina veterinária da UFRB, os protocolos CEUAS obedecem as numerações a seguir 23007004595/2016-83 e 57/2016/CEUA-UFBA.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço aos meus pais, Fábio Alex Fernandes Xavier e Lucilene Passos Cortes, pelo apoio à mim concedido, pelo amor, carinho, por tudo, sem vocês eu não seria nada.

Agradeço à minha avó, Regina Célia Fernandes Xavier, por sempre me apoiar, levantar minha estima e se mostrar preocupada em cada passo dessa minha jornada.

Agradeço aos meus irmãos, Pedro Passos Fernandes e Fábio Alex Fernandes Xavier Junior, minha vitória é de vocês e a de vocês é nossa, afinal somos um time.

Agradeço aos meus amigos da graduação que me ajudaram imensamente, tanto com estudos, quanto com conversas, apoio e conselhos, mas não vou citar ninguém aqui, para não deixar ninguém de fora, quem me ajudou de qualquer forma que seja, sabe quem é, e vocês eu vou levar no coração e deixar registrado neste TCC pra sempre.

Agradeço ao meu orientador, Robson Bahia Cerqueira, pela força, apoio, orientação, amizade e pela confiança de me orientar desde o meu primeiro PIBIC, o que me fez evoluir como estudante, pesquisador e pessoa, só tenho gratidão.

## RESUMO

A cinomose é uma enfermidade causada pelo vírus Canine Distemper Virus (CDV). Essa doença afeta principalmente cães, mas também acomete outras espécies domésticas e selvagens. A imunidade do animal está relacionada ao grau que a esse patógeno vai atingir o organismo do indivíduo. Ela afeta a respiração do animal, pode causar vômito, diarreia, convulsões, podendo levar o animal à óbito. O objetivo do presente trabalho foi padronizar um teste ELISA indireto para diagnosticar cinomose em amostras de soro de cães utilizando como antígeno, estruturas de superfície viral. Para padronização da técnica, fez-se necessário o estudo da diluição do antígeno para identificar a melhor concentração para sensibilização da placa. O antígeno foi realizado a partir do isolado da cepa Snyder Hill (ATCC VR-526 – Manassas, EUA) do vírus da cinomose e foi utilizado como antígeno para testes imunodiagnósticos. O teste foi aplicado primeiramente com diferentes diluições do antígeno para detecção do melhor desempenho do antígeno. Feito isso, foi testado em um banco de soro com 90 amostras, sendo 45 amostras de animais clínicos e sorologicamente comprovadamente negativos e 45 amostras de animais e clínicos e sorologicamente comprovadamente positivos em um teste ELISA comercial. Foi estabelecido um gradiente de cor para a leitura dos resultados sem a necessidade do leitor de microplaca. Foi calculado o ponto de corte, especificidade e sensibilidade do teste. O teste ELISA indireto se mostrou com excelência como um teste de diagnóstico para a cinomose canina, obtendo-se ponto de corte de densidade óptica de 0,229, sensibilidade de 95,5% e especificidade de 84,4%. O gradiente de cor criado se mostrou com eficácia para a leitura dos resultados do teste sem a necessidade do leitor de microplaca.

**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 standardize an indirect ELISA test to diagnose distemper in serum samples from dogs using viral surface structures as antigen. To standardize the technique, it was necessary to study the antigen dilution to identify the best concentration for plaque sensitization. The antigen was made from the isolate of the Snyder Hill strain (ATCC VR-526 – Manassas, USA) of the distemper virus and was used as an antigen for immunodiagnostic tests. The test was first applied with different dilutions of the antigen to detect the best performance of the antigen. Once this was done, it was tested in a serum bank with 90 samples, 45 of which were clinically and serologically proven negative animal samples and 45 clinically and serologically proven positive animal samples in a commercial ELISA test. A color gradient was established for reading the results without the need for a microplate reader. The cut-off point, specificity and sensitivity of the test were calculated. The indirect ELISA test proved to be excellent as a diagnostic test for canine distemper, with an optical density cut-off of 0.229, sensitivity of 95.5% and specificity of 84.4%. The created color gradient proved to be effective for reading the test results without the need for a microplate reader.

**Key Word:** CDV; Infectious Diseases; Immunodiagnosis.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 01</b> - Estrutura do Vírus da Cinomose Canina.....	16
<b>Figura 02</b> - Ciclo natural do vírus da Cinomose.....	18
<b>Figura 03</b> - Esquema da estimulação da resposta imune.....	20
<b>Figura 04</b> - Ciclo replicativo do Mobilivirus.....	22
<b>Figura 05</b> - Corpúsculos de Lentz no citoplasma e na região intra-eritrocitária de leucócito (localizado por setas) de cães com suspeita clínica de cinomose .....	25
<b>Figura 06</b> - Mapa com a diagramação das diluições e padronizações quantitativas por poço da utilização do antígeno do teste ELISA indireto no diagnóstico da cinomose canina.....	30
<b>Figura 07</b> - Resultados da titulação do antígeno utilizado para padronização do ELISA indireto para o diagnóstico da cinomose canina. Nessa etapa foi determinado também diluição do conjugado e diluição da amostra teste, sendo o conjugado 1:15000 e soro teste 1:200.....	33
<b>Figura 08</b> - Resultados do teste ELISA indireto aplicado em amostras de cães diagnosticados como positivos para cinomose canina clínica e sorologicamente utilizando um teste ELISA comercial.....	34
<b>Figura 09</b> - Resultados do teste ELISA indireto aplicado em amostras de cães diagnosticados clínica e sorologicamente negativos para cinomose canina.....	35
<b>Figura 10</b> - Amostras de soro canino de animais comprovadamente negativos para cinomose canina. Amostras submetidas ao ELISA indireto sem frear com H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	36
<b>Figura 11</b> - Amostras de soro canino de animais comprovadamente positivos para cinomose canina. Amostras submetidas ao ELISA indireto sem frear com H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	37

<b>Figura 12</b> - Amostras de soro canino de animais comprovadamente negativos para cinomose canina. Amostras submetidas ao ELISA indireto com freamento com H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	38
<b>Figura 13</b> - Amostras de soro canino de animais comprovadamente positivos para cinomose canina. Amostras submetidas ao ELISA indireto com freamento com H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	39
<b>Figura 14</b> - Elisa indireto aplicado em amostras de soro canino do bairro Inocop em Cruz das Almas – Bahia.....	40
<b>Figura 15</b> - Amostras de soro canino de animais da cidade de Cruz das Almas-Ba atendidos no HUMV-UFRB submetido ao teste ELISA indireto para o diagnóstico da cinomose canina.....	41
<b>Figura 16</b> - Elisa indireto aplicado em amostras de soro canino do HUMV de brucella canis.....	42
<b>Figura 17</b> - Elisa indireto aplicado em amostras de soro de Marsupiais .....	43
<b>Figura 18</b> - Elisa indireto aplicado em amostras de soro canino do bairro Tabela em Cruz das Almas – Bahia.....	44
<b>Figura 19</b> - Elisa indireto aplicado em amostras de soro de primatas.....	45
<b>Figura 20</b> - Elisa indireto aplicado em amostras de soro de primatas.....	45

## SUMÁRIO

1.	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	12
2.	<b>OBJETIVO</b> .....	13
2.1.	<b>Objetivo geral</b> .....	13
2.2.	<b>Objetivos específicos</b> .....	13
3.	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	14
3.1.	<b>Agente etiológico</b> .....	14
3.2.	<b>Epidemiologia e transmissibilidade</b> .....	15
3.3.	<b>Replicação viral e patogênese</b> .....	17
3.4.	<b>Resposta imune, celular e humoral</b> .....	20
3.5.	<b>Diagnóstico</b> .....	21
3.6.	<b>Tratamento</b> .....	25
3.7.	<b>Medidas profiláticas e controle</b> .....	26
4.	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	28
4.1.	<b>Características do antígeno, diluições e determinação do protocolo ELISA indireto</b> .....	28
4.2.	<b>Amostras submetidas à padronização</b> .....	28
4.3.	<b>Amostras submetidas à padronização</b> .....	29
4.4.	<b>Estudo da sensibilidade, especificidade, valor preditivo e ponto de corte</b> .....	29
4.4.	<b>Determinação do gradiente de coloração</b> .....	31
4.5	<b>Aplicação do teste padronizado em amostras de soro canino e soro de animais silvestres</b> .....	31
5.	<b>RESULTADOS</b> .....	32
6.	<b>DISCUSSÃO</b> .....	45
7.	<b>CONCLUSÃO</b> .....	48
8.	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	49
9.	<b>ANEXOS</b> .....	56

## 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 e selvagens. A imunidade do animal está relacionada ao grau que a esse patógeno vai atingir o organismo do indivíduo. Ela afeta a respiração do animal, pode causar vômito, diarreia, convulsões, podendo levar o animal a óbito.

A transmissão do vírus 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). Barbosa *et. al.*, (2011) descrevem que quanto ao sexo, os machos se mostraram menos predispostos à doença que as fêmeas. Quanto à idade, os animais jovens e adultos se mostraram mais predispostos que animais mais velhos.

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, no qual neste, infecta os linfócitos maduros e promove a apoptose e conseqüentemente diminuição da imunidade do animal.

O exame clínico é o primeiro a ser realizado, a anamnese, analisando os sinais clínicos e evolução da doença. Exames laboratoriais podem confirmar a doença em animais suspeitos, exames esses como PCR, imunofluorescência direta e indireta, imunohistoquímica e os testes ELISA (direto, indireto, competitivo e kits comerciais). O teste ELISA indireto é utilizado para detectar anticorpos do CDV em amostras de sangue, plasma ou líquor. O mais utilizado para o diagnóstico desta enfermidade são os testes ELISAs comerciais. A falta da diversidade 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.

## **2. OBJETIVO**

### **2.1 Objetivo geral**

- Padronizar um teste ELISA indireto para diagnóstico da cinomose canina e aplicá-la em amostras de soro de cães e outras espécies susceptíveis.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Estudar antígeno de superfície com a finalidade de usar na padronização do ELISA indireto.
- Determinar o ponto de corte do teste padronizado.
- Determinar a sensibilidade e especificidade
- Estabelecer um gradiente de cor para interpretação dos resultados positivos e negativos com a finalidade de realização de leitura do ELISA indireto sem o leitor de microplacas.
- Aplicar o teste em amostras de soro canino de diferentes bairros de Cruz das Almas - Bahia.
- Aplicar o teste em amostras de soro de outras espécies como marsupiais e primatas.

### 3. REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1. Agente etiológico

Laidlaw e Duncan (1926) descreveram o vírus da cinomose como pertencente à família Paramixoviridae e ao gênero Morbilivírus. É um RNA-vírus envelopado de fita simples e grande, medindo de 150 à 350 nm e possui simetria helicoidal. A constituição das cepas atenuadas e virulentas é diferenciadas através da habilidade de replicação em várias culturas celulares de macrófagos, linfócitos e células epiteliais.

Sua morfologia é constituída por seis proteínas estruturais, sendo três internas (L, N e P) e três inseridas no envelope (M, H e F). Sendo que a proteína N, o nucleocapsídeo, é responsável pela proteção do material genético. As proteínas L e P, que formam o complexo polimerase, se encontram envolvidas na transcrição e na replicação do RNA viral. A matriz, proteína M, é importante para a maturação viral e conecta as glicoproteínas de superfície ao nucleocapsídeo. As proteínas F, de fusão, e H, hemaglutinina, desempenham papéis importantes na patogenia da doença. A proteína H é responsável pela adsorção e a F, pela fusão do vírus à célula hospedeira. A proteína H é bastante variável, sendo assim a principal responsável pela diversidade antigênica observada no vírus da cinomose e está diretamente envolvida na indução da resposta imune do hospedeiro à infecção (Orsini *et. al.*, 2008), Figura 1.

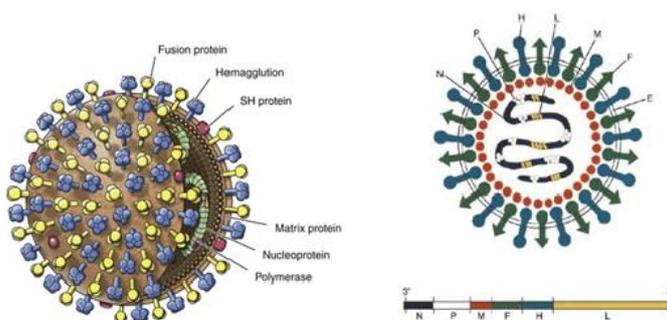


Figura 1: Vírus da cinomose Canina. (Fonte: Veterian key). Estrutura do vírus da cinomose (E: envelope de lipoproteína; F: proteína de fusão; H: hemaglutinina; L: proteína grande; M: proteína da matriz; N: nucleocapsídeo).

### 3.2. Epidemiologia e transmissibilidade

A cinomose é uma enfermidade de caráter mundial, porém, devido à vacinação regular da população canina, em alguns países a doença tem sido controlada, diminuindo os relatos (Negrão *et. al.*, 2006). No Brasil, a cinomose é considerada uma enfermidade endêmica, representando até 6% de todas ocorrências clínicas e é responsável por até 11% de morte de cães (Sonne *et. al.*, 2009).

A cinomose é uma enfermidade endêmica do nordeste brasileiro, principalmente na região semiárida como apresenta Silva *et. al.*, 2021. Em sua pesquisa, de 67 cães analisados através de métodos como exames clínicos, achados hematológicos e testes imunocromatográficos, 32 animais (47%) apresentou positividade para a enfermidade.

A transmissão do vírus da cinomose ocorre por aerossóis, alimentos, água e fômites contaminados. A principal forma de transmissão do vírus se dá através de aerossol e gotículas provenientes de secreções de animais doentes ou infectados. A transmissão também pode ocorrer por contato de animais saudáveis com secreções e excreções de animais infectados podendo ser eliminado durante meses no ambiente pelas urinas, fezes, saliva e secreções (Correa *et. al.*, 1991; Litfalla *et. al.*, 2008). O cuidado com a higienização dos ambientes se mostra importante para evitar a proliferação entre os animais domésticos. Em cães jovens (quatro à seis semanas de idade), há a possibilidade de ocorrer a transmissão transplacentária, porém não é comum (Sherding *et. al.*, 2003). Cadelas prenhas infectadas são aptas à transmitir o vírus por via transplacentária, podendo assim causar abortamentos, fetos natimortos ou o nascimento de filhotes fracos e imunossuprimidos (Arns *et. al.*, 2012).

Segundo um estudo realizado no Maranhão por Freitas-Filho *et. al.*, (2014), utilizando-se do diagnóstico clínico e parâmetros hematológicos, foram avaliados 246 animais de variadas idades e sexo, destes, 24,80% foram diagnosticados como saudável, 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%.

A idade dos cães analisados por Sonne *et. al.*, (2009) diagnosticados com a enfermidade através de achados patológicos e imuno-histoquímicos variou de dois meses à oito anos. Em sua pesquisa, 51 animais tiveram a idade informada na consulta clínica, e em três cães adultos não tinham esta informação. Dos animais com a idade cadastrada, 40 apresentavam idade de dois à seis meses (78,5%), em seis cães, a idade variou de sete meses à um ano (11,8%), três apresentavam idade de um à quatro anos (5,8%) e dois apresentavam idade de quatro à oito anos (3,9%). Dos 54 cães analisados, 32 eram machos (59,26%) e 22 fêmeas (40,74%).

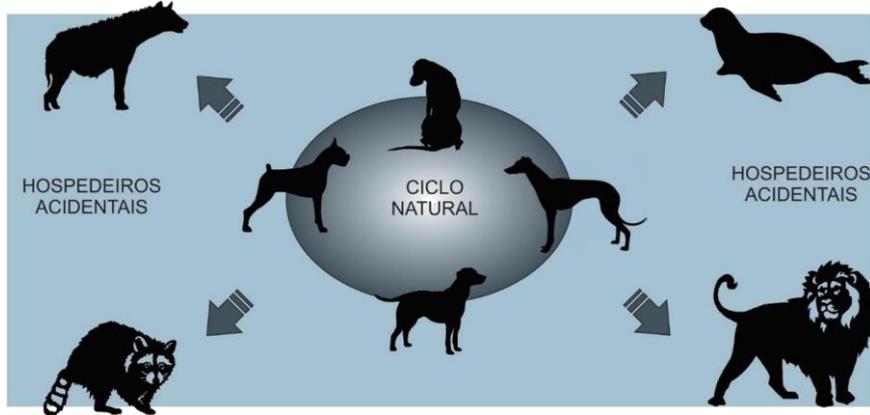
A eliminação do vírus acontece principalmente na fase aguda, entre uma à duas semanas de idade, porém, cães que apresentam sinais de infecção somente no SNC dificilmente eliminam o vírus para o meio ambiente (Nelson & Couto, 2001).

Sendo a transmissão realizada por excreções corporais, os animais infectados podem excretar o agente etiológico em urinas, fezes, saliva, placenta e secreções nasais, apresentando ou não sinais clínicos da enfermidade. O CDV sobrevive em exsudatos por aproximadamente 20 minutos e é sensível à maioria dos desinfetantes hospitalares comuns (Martins *et. al.*, 2009).

A cinomose canina provoca um grande comprometimento à saúde e conservação de inúmeras espécie de carnívoros selvagens, uma vez que está relacionada à declínio populacionais destes animais (Van De Bildt *et. al.*, 2002). Dentre os morbilivírus, o vírus da cinomose está afetando 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).

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*), 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 (Figura 2).



Fonte: Instituto de Ciência Básicas de Saúde – UFRGS (2015)

Figura 2: Ciclo natural do vírus da Cinomose e sua transmissão de animais hospedeiros naturais do patógeno à animais considerados hospedeiros acidentais.

### 3.3. Replicação viral e Patogênese

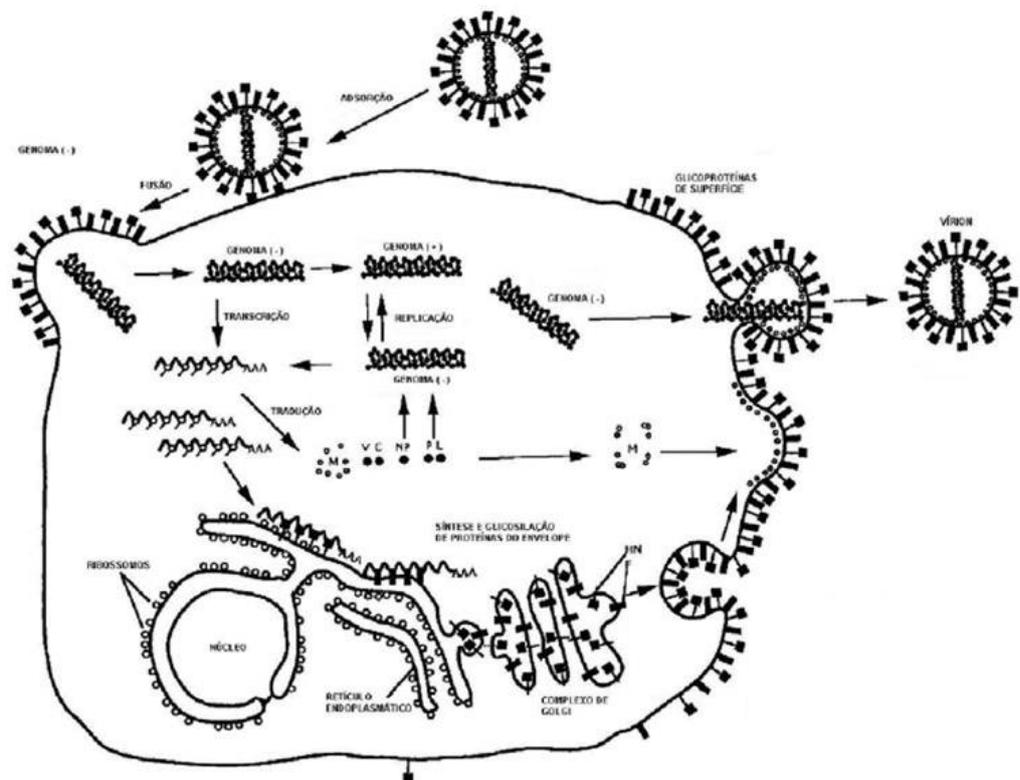
Como foi desenvolvido no tópico anterior o CDV pode se replicar em inúmeros tipos celulares, porém as células linfoides e os macrófagos se mostram mais susceptíveis. Ao infectar essas células, o vírus se dissemina para alguns órgãos linfoides, como baço, timo, linfonodos e medula óssea, onde infecta os linfócitos maduros, promovendo a apoptose e consequente imunodepressão (Barbosa *et. al.*, 2011; Day *et al.*, 2016). A maioria dos animais provavelmente é infectada pela inalação do vírus e os primeiros locais de atividade viral são as tonsilas palatinas e os linfonodos brônquicos. De lá, o vírus atinge a corrente sanguínea em média de dois dias, conduzidos por macrófagos, passando pelos vasos linfáticos. Depois do transporte realizado por células mononucleares circulantes, o vírus é encontrado se multiplicando na medula óssea, baço e outros tecidos linfoides uma semana após a infecção (Headley *et. al.*, 2012; Sawatskye Von Messling, 2010). O vírus se adere à célula por proteínas receptoras, realizando a adsorção, posteriormente, deixando

seu envelope na membrana celular, adentrando a célula com seu material interno, se replica no citoplasma e sai da célula por brotamento ou exocitose, podendo levar à lise celular, Figura 3.

Uma viremia na primeira semana após a infecção acontece concomitantemente à proliferação viral nos órgãos linfoides associados à leucopenia por linfopenia, causando danos às células linfoides B e T. No quinto e sexto dia após a infecção, se espalha para o pulmão e lâmina própria da nasofaringe e mucosa conjuntival. Uma segunda viremia, com o vírus associado à célula e fase plasmática pode ocorrer entre o oitavo ao décimo quarto dia após a infecção, podendo acontecer até o vigésimo dia. O estágio virêmico pode durar até seis semanas (Braz *et. al.*, 2009; Moss e Griffin, 2006; Greene e Appel, 2006).

O vírus se replica primeiramente nas células macrófagos do trato respiratório, ocasionando o primeiro pico febril, de três à seis dias após a infecção. Dissemina-se para as tonsilas e os linfonodos bronquiais, acontecendo posteriormente uma viremia associada à célula, com disseminação para outros tecidos linforreticulares e por via hematogena, o vírus é replicado para o trato gastrointestinal =, respiratório, urogenital, podendo chegar até ao sistema nervoso central (SNC) (Greene *et. al.*, 2006; Quinn *et. al.*, 2005).

A multiplicação viral nessas áreas é responsável pela linfocitólise e pela leucopenia. Posteriormente, sendo conduzido por células mononucleares migrantes, o vírus começa a aparecer em estruturas epiteliais em todo corpo e depois de um período de multiplicação nestes locais, em algumas semanas, os sinais clínicos causados pelas lesões epiteliais começam a aparecer (Braz *et. al.*, 2009; Birchard e Sherding, 2003).



Fonte: Esgana CDV – Canine Distemper Virus

Figura 3: Ciclo replicativo do Mobilivírus.

Axrhelm e Krakowka, (1987) relatam que o vírus da cinomose pode penetrar o SNC através de inúmeros pontos de entrada, e que o endotélio vascular talvez seja o primeiro componente do SNC que sofre infecção através do contato, ou com o vírus livre do plasma, ou com complexos formados por vírus, IgG e plaquetas e após infectar o endotélio, o vírus da cinomose passa para os astrócitos, atravessando estes até atingir então os neurônios. Para Summers *et. al.*, (1995), na maioria dos casos de infecção por CDV, o mesmo atinge o encéfalo, ainda que o animal não apresente manifestação de transtorno neurológico.

O comportamento do vírus no SNC depende de alguns fatores, sendo eles a estirpe viral, idade e sistema imunológico do animal. Em cães jovens com imunodeficiência, os animais podem desenvolver necrose neuronal, já em cães adultos e com imunocompetência, normalmente apresentam desmielinização.

A efetividade da resposta imune determina a velocidade e extensão da disseminação nos tecidos e órgãos afetados pela enfermidade. O vírus que infecta os neurônios e células gliais dentro do SNC podem permanecer pela região por muito tempo, causando lesões consideráveis, como encefalite ou encefalomielite (Quinn *et. al.*, 2005).

### 3.4. Resposta imune, celular e humoral

Moléculas sinalizadoras de linfócitos ativados, chamados de, SLAM e CD150 são receptores celulares para enfermidades virais. As moléculas estão expressas em algumas células do sistema imunológico como macrófagos, células B e T, células dendríticas maduras, justificando a capacidade do CDV a disseminarem através do sistema imune (Tatsuo *et. al.*, 2000). Os sinais clínicos se apresentam pouco tempo após a contaminação do animal e acomete o trato respiratório, gastrointestinal e o sistema neurológico, dependendo do tecido onde o vírus se desenvolve (Dias *et. al.*, 2013). A infecção pelo CDV estimula alta concentração de anticorpos tanto na infecção natural ou vacinação realizada de maneira adequada. Esses anticorpos podem ser detectados com técnicas laboratoriais como ELISAs, imunofluorescência indireta ou soroneutralização (Biazzono, Hagiwara, Corrêa, 2001).

Durante a primeira semana de infecção, os cães apresentam linfopenia e são imunossuprimidos devido à lise de células e a infecção pelo CDV parece causar um efeito de depleção de células T e B e de necrose de tecidos linfáticos. Os cães que se recuperam precocemente com poucos sinais clínicos respondem com vigorosas reações imunes humoral e celular, produzindo desta forma uma imunidade permanente. Anticorpos neutralizantes aparecem inicialmente no soro de cães infectados de oito à nove dias após a exposição viral, alcançando um pico em 15 semanas. Estes anticorpos persistem até mesmo em um nível consideravelmente alto na maioria dos animais por pelo menos um ano após a infecção. Os níveis de IgM antiviral são equivalentes tanto em cães infectados de maneira persistente, quanto em animais recuperados da enfermidade. Enquanto níveis altos de IgG são vistos apenas em animais recuperados. O animal acometido pode apresentar a

resposta imune adequada, na qual o mesmo possui altas quantidade de anticorpos e células de defesa do organismo, enquanto o animal que apresenta a resposta imune inadequada, o mesmo pode não apresentar resposta devido à pouca quantidade de anticorpos ou não apresentar anticorpos contra o patógeno, (Tizard *et. al.*, 2002), Figura 4.

A forma mais grave da infecção pelo CDV está associada ao declínio sistêmicos das áreas dependentes dos linfócitos T e B, situadas em tecidos linfoides, enquanto em cães debilitados ou com a infecção persistente à repopulação de tecidos linfoides com formações de centros de germinação associadas ocorre de duas a três semanas após a contaminação (Zee *et. al.*, 2003).

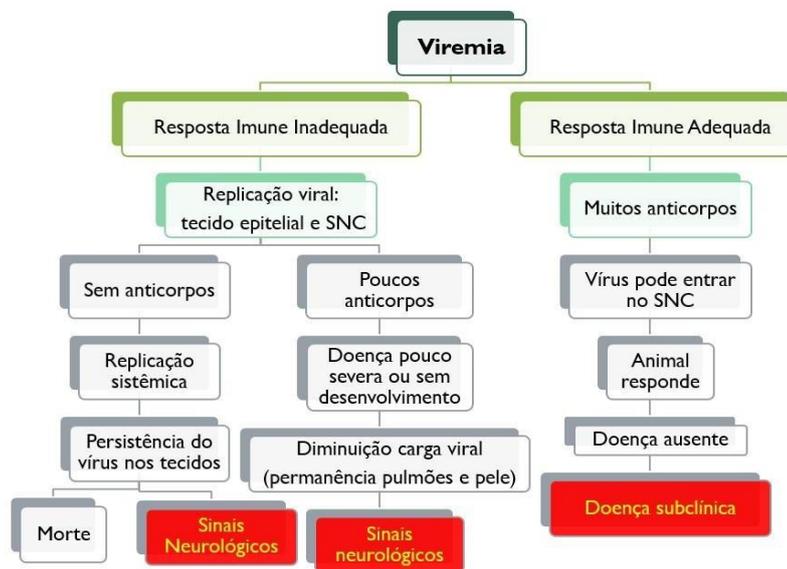


Figura 4: Esquema da estimulação da resposta imune.

### 3.5. Diagnóstico

O exame clínico-epidemiológico é o primeiro a ser realizada, a anamnese, questionando ao responsável se houve contato do animal com outros animais, se o animal possui acesso à rua e outros motivos que podem ter levado o animal à contaminação. A análise dos sinais clínicos também é de extrema importância para que o médico veterinário desconfie da enfermidade, sinais esses que variam de

acordo com o tecido acometido pelo vírus, uma vez que o mesmo é transportado pela corrente sanguínea para alguns órgãos e tecidos, sinais como secreções oculares e conjuntivite severa na fase oftalmológica (fase em que o vírus atinge o sistema ocular), secreção nasal, tosse e até pneumonia na fase respiratória (fase em que o vírus atinge o sistema respiratório), pústulas abdominais e hiperqueratose dos coxins plantares na pele na fase tegumentar (fase em que o vírus atinge o tecido epitelial), na fase digestiva (fase em que o vírus atinge o sistema gastrointestinal) o animal pode apresentar vômitos e diarreias, na fase neurológica, pode apresentar tremores musculares, incoordenação motora e convulsões, porém nenhum destes sinais são patognomônicos da cinomose em cães, se fazendo necessário os testes laboratoriais (Souza *et. al.*, 2015).

O vírus da cinomose canina pode estar presente em uma grande quantidade de amostras biológicas e em vários estágios da infecção, Podem se apresentar o vírus com títulos variados, tanto o sangue total, quanto a urina, as fezes, secreções respiratórias, líquor (Negrão *et. al.*, 2007). Devido ao fato do exame clínico não ser conclusivo, se faz necessário um diagnóstico mais preciso para a cinomose canina, podendo ser realizado por métodos diretos, como isolamento, histopatologia, testes moleculares, testes ELISAs, imunofluorescência direta e indireta, imunohistoquímica, soroneutralização e PCR (Gebara *et. al.*, 2004; Amude *et. al.*, 2007).

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 e sua eficácia na fase crônica da doença se mostra melhor (Bento *et. al.*, 2013).

Na fase aguda, o exame de imunofluorescência se mostrou mais eficaz para diagnosticar a cinomose canina pois a titulação do antígeno pode interferir no resultado, apresentando maiores quantidades de falsos positivos ou negativos, assim como interfere na PCR, e por isso recomenda-se testá-lo na fase crônica (Greene & Vandeveld, 2015).

O isolamento pode ser realizado através da inoculação das amostras clínicas (secreção nasal, ocular e sangue) em células de linhagem. Os efeitos citopáticos observados são lises celulares considerados efeitos citopáticos, assim como formação de sincício, deslocamento da monocamada e arredondamento celular. A monocamada pode ser corada com cristal violeta e os corpúsculos de inclusão podem ser vistos tanto intranuclear como intracitoplasmático (Barbosa *et. al.*, 2011).

Utilizando a técnica de imunohistoquímica, teste que visa localizar antígenos (e.g. proteínas) em tecidos, partindo do princípio da ligação específica de anticorpos à antígenos no tecido biológico. Pode ser realizado ante-mortem utilizando mucosa nasal, epitélio dos coxins e pele (tecido do pescoço dorsal), ou pós-morte a partir de tecidos do baço, tonsilas, linfonodos, estômago, pulmão, duodeno, bexiga e cérebro. Os resultados normalmente mais precisos na fase aguda da infecção da enfermidade (Braz, 2009).

Há duas formas as quais a imunofluorescência pode ser realizada, a imunofluorescência indireta (IFI) e a imunofluorescência direta (IFD). Em sua forma indireta, o teste é dividido em duas etapas, na qual a primeira, o anticorpo anti-cinomose não marcado é introduzido, enquanto na segunda etapa, é adicionado um anticorpo anti-imunoglobulina. Na forma direta, anticorpo anti-cinomose é mostrado com um corante conhecido como isotiocianato de fluoresceína (ITFC). Esta técnica é aplicada ao diagnóstico de cinomose canina desde o primórdio da descoberta do vírus, e tem sido a técnica de escolha para o diagnóstico laboratorial da enfermidade (Thompson *et. al.*, 1989).

Inúmeras amostras clínicas têm potencial para serem utilizadas na IFD, tais como impressão genital, esfregaço nasal e amostra sanguínea. O vírus pode ser detectado no sangue a partir do terceiro dia após a infecção, se estendendo até o 17º dia, detectando-os dois dias antes do pico febril. No esfregaço do tecido conjuntivo, o vírus pode aparecer a partir do nono dia pós-infecção, a detecção depende do estado febril ou a fase em que o animal se encontra, se aguda ou crônica. Porém, os esfregaços das conjuntivas se dispõem a serem positivos casuais, enquanto o sangue é constantemente positivo. Células da mucosa genital

foram positivas no quinto dia (infecção experimental via intracranial e intravenosa) e do sétimo ao 10º dia (oronasal) (de Moraes *et. al.*, 2013).

Barbosa *et. al.*, (2011) dizem que a observação da inclusão viral do corpúsculo de Lentz em eritrócitos ou leucócitos representa o diagnóstico conclusivo da enfermidade por representarem o efeito citopático do vírus sobre estas células. As inclusões aparecem como corpúsculos redondos ou ovalados, com coloração eosinofílica quando presente no citoplasma de linfócitos e monócitos, eosinofílico à basofílico, em neutrófilos e nas hemácias apresentam formas arredondadas ou irregulares e de coloração azul clara, rósea ou vermelhoacastanhada, Figura 5.

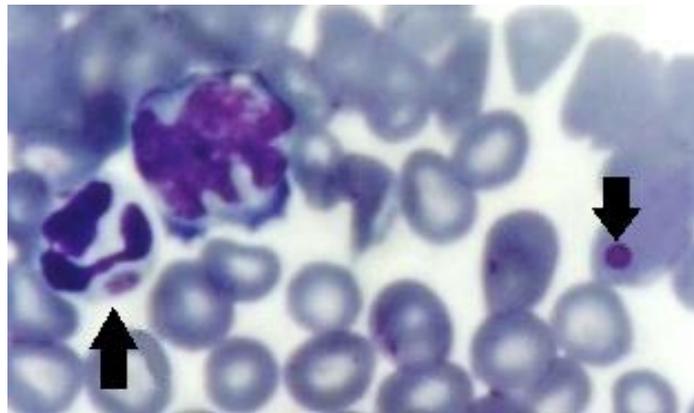


Figura 5: Corpúsculos de Lentz no citoplasma e na região intra-eritrocitária de leucócito (localizado por setas) de cães com suspeita clínica de cinomose.

Fonte: Silva et al. (2005).

Vários animais vêm à óbito devido à cinomose podem ou não manifestar títulos mensuráveis de anticorpos, fazendo com que as técnicas de diagnóstico sorológico apresentem um resultado limitado para esta enfermidade (Gebara, *et. al.*, 2004). Também existe a possibilidade de que os altos títulos de anticorpos possam ser resultantes de vacinação prévia, assim como infecção clínica ou subclínica anteriores e os baixos títulos podem ser decorrentes às propriedades imunossupressoras do CDV (Alves, 2006).

### 3.6. Tratamento

O tratamento da cinomose varia de acordo com o nível da enfermidade e sinais clínicos do animal, sendo tratados os sinais clínicos e não o patógeno diretamente. O tratamento se dá por antidiarreicos e fluidoterapia para animais com o sistema gastrointestinal acometido, anticonvulsivantes e fisioterapia para animais que apresentam sinais musculares, broncodilatadores e expectorantes para animais que foram acometidos no sistema respiratório, para combater enfermidades bacterianas e parasitárias concomitantes que podem piorar o quadro do animal são utilizados antieméticos e antimicrobianos. Animais com sistema neurológico afetado precisam de um cuidado maior devido a gravidade da enfermidade nesses indivíduos (Tabanez, 2019).

Corrêa & Corrêa (1992) indicam a administração de soro hiperimmune específico de uma vez só, o distribuindo em várias regiões via subcutânea, conforme o volume necessário, este soro possui ação fundamental para soroneutralização, e deve-se apresentar de uma só vez a soroneutralização de todos os vírus livres, que ocasionalmente, vão se libertar nos dias posteriores. O soro hiperimmune permanece ativo no animal por cerca de 15 à 30 dias no animal, abaixando a titulação progressivamente, seja pela soroneutralização mencionada anteriormente, onde são formados complexos de antígeno, seja pela metabolização e eliminação progressiva, podendo assim estimar a dosagem para apresentar uma quantidade excessiva de anticorpos soroneutralizantes e não faltar. Quando o animal apresenta alterações no sistema nervoso, o soro hiperimmune não consegue impedir o avanço da enfermidade, pois apenas neutraliza os vírus circulantes e não atuam sobre as partículas virais que ultrapassaram a barreira hematocefálica.

Os animais com infecção no trato respiratório superior ou pneumonia que frequentemente é ocasionada por infecções bacterianas secundárias, geralmente pela *Bordetella bronchiseptica*, o tratamento da pneumonia deve ser realizada através de antimicrobianos de amplo espectro ativos. São recomendados ampicilina, cloranfenicol, florfenicol, ceftiofur, fluorquinolonas e aminoglicosídeos. Em casos do animal apresentar diarreia, o mais recomendado é a utilização de antidiarreicos

complexos que contenham pectina, caolim ou outros adsorventes. Alimentação e água devem ser suspensos em caso de vômito e diarreia, e é necessário que haja a utilização de antieméticos parentais (Corrêa & Correa, 1992; Greene, 2006)

### 3.7. Medidas profiláticas e controle

O controle e profilaxia da doença são recomendados pelo isolamento dos animais acometidos, para que não transmitam a doença para outros indivíduos. Desinfecção do ambiente e a vacinação se mostram extremamente importante para o controle da enfermidade. A imunização dos animais também evita que o patógeno se prolifere. Animais que entrem em contato com o indivíduo infectado ou fômites podem acometer outros animais assim como contaminação do ambiente (Tabanez, 2019).

Pelas primeiras semanas de vida do animal, o mesmo apresenta proteção natural contra algumas infecções, porém normalmente o sistema imune do animal não está totalmente capacitado para suportar uma infecção por um vírus altamente patogênico e virulento, se fazendo necessária a transferência passiva de imunoglobulinas. Existe uma variação individual no nível de proteção, dependendo da imunidade materna, o que define o título de anticorpos, e da quantidade de ingestão de colostro pelo filhote. Os anticorpos transferidos de forma passiva são catabolizados no organismo do filhote, gerando diminuição e meia-vida de cerca de 8,4 dias (Hoskins *et. al.*, 2004)

Após a exposição ao agente infeccioso, se desenvolve uma imunidade relativamente longa, com anticorpos neutralizantes, durando por muitos anos. As vacinas produzidas com amostras do CDV isolada de cães naturalmente infectados, como as amostras Snyder Hill, Rockborn, Onderstepoort, adequadamente atenuadas em culturas de células, são eficientes em induzir o estado de imunidade nos animais vacinados, protegendo contra a infecção. Os níveis mais altos de anticorpos são observados quando os títulos vacinais são maiores (Martins, 2009).

Biazzono, Hagiwara, Corrêa, (2001); Gillespie *et. al.*, (1958) relatam que vestígios da imunidade passiva podem interferir na vacinação dos animais, pelo fato de ser o antígeno vacinal atenuados pelos anticorpos circulantes. Preconizam também que apenas quando o título para o CDV cai dentro do intervalo de 20 e 100 é que o filhote se torna susceptível ao vírus virulento e apto ao responder ao vírus vacinal.

Títulos maiores que 20 a 30 bloqueiam a replicação do vírus vacinal no organismo hospedeiro, condição considerada essencial para a resposta imune. Níveis altos de anticorpos para bloquear a resposta à vacinação podem vir a falhar na proteção da infecção pelo agente etiológico. O recomendado é que o cão deve ser vacinado quando se tornar soronegativo, assegurando-se a máxima resposta sorológica pós-vacinal, associada com a proteção de mais longa duração (Carmichael, 1989).

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1. Características do antígeno, diluições e determinação do protocolo ELISA indireto**

O antígeno foi cedido gentilmente pelo Laboratório de Doenças Infecciosas do Hospital Veterinário da UNIME- Lauro de Freitas-Ba. O isolado Snyder Hill (ATCC VR-526 – Manassas, EUA) do vírus da cinomose foi utilizado como antígeno para testes imunodiagnósticos. O vírus foi propagado em células MDCK na 255ª passagem e mantido em Meio Essencial Mínimo (Cultilab), suplementado com 0,2g/L de estreptomicina, 0,15g/L de penicilina G potássica e 10% SFB, em pH 7,2. A 3ª passagem do vírus nestas células foi alicotada e armazenada em temperatura - 18°C. A caracterização desse antígeno foi considerada como proteínas de superfície. Para determinar a concentração de antígeno a ser utilizado no teste ELISA indireto para diagnóstico da cinomose em cães, foi sensibilizada uma placa de poliestileno com 96 poços (KASVI), utilizando tampão carbonato-bicarbonato e diferentes diluições do antígeno, sendo na coluna 1 e 2, 1:50, na coluna 3 e 4, 1:100, na coluna 5 e 6, 1:200, na coluna 7 e 8, 1:400, na coluna 9 e 10, 1:800, e na coluna 11 e 12, 1:1600, conforme a Figura 6.

## TITULAÇÃO DO ANTÍGENO

DILUIÇÃO EM:

	1:50		1:100		1:200		1:400		1:800		1:1600	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Branco 50µl	Branco 100µl										
B	Branco 50µl	Branco 100µl										
C	Negat. 50µl	Negat. 100µl										
D	Negat. 50µl	Negat. 100µl										
E	Posit. 50µl	Posit. 100µl										
F	Posit. 50µl	Posit. 100µl										
G	Soro Teste 50µl	Soro Teste 100µl										
H	Soro Teste 50µl	Soro Teste 100µl										

Figura 6 - Mapa com a diagramação das diluições e padronizações quantitativas por poço da utilização do antígeno do teste ELISA indireto no diagnóstico da cinomose canina.

A placa foi 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 o branco (meio de diluição do soros - fileira A e B), soro comprovadamente negativo (fileiras C e D), soro comprovadamente positivo (fileiras E e F) e soro teste (fileiras G e H). 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 volume) + 60 µg de OPD). A reação foi freada com ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) após média de 30 minutos e lida no espectrofotômetro com filtro de 492 nm.

### 4.2. Amostras submetidas à padronização

O respectivo teste foi aplicado em 90 amostras de soro canino, sendo 45 amostras de animais comprovadamente negativos e 45 amostras de animais comprovadamente positivos. Essas amostras fazem parte de um banco de soro armazenado no laboratório de Doenças Infecciosas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB). Foram utilizadas amostras de animais clinicamente positivos e animais clinicamente negativos submetidos a exames laboratoriais e sorologia de kit comercial para pesquisa de anticorpo chamado de Accuvet CDV/CPV Ac Test. Esse kit apresenta desempenho de sensibilidade e especificidade de 99,10% e 98% respectivamente.

#### 4.3. Estudo do Ponto de corte, sensibilidade e especificidade

O ponto de corte foi determinado através do cálculo da média de animais não reagentes acrescido de três vezes o desvio padrão populacional (Média aritmética de não reagentes + 3 • Desvio padrão populacional) baseada em Frey, A.; DI Canzio, J.; Zurakowski, D, (1998). Para o estudo da sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo e acurácia foram calculados com as fórmulas preconizadas por Soares *et. al.*, (2012), Tabela 1.

Condição do paciente	Doentes	Não-doentes	Total
<b>Resultado do teste</b>			
Positivo	a	b	a+b
Negativo	c	d	c+d
Total	a+c	b+d	a+b+c+d (N)

Tabela 1-  
Representação

ação do cálculo da sensibilidade, especificidade, valores preditivos e acurácia

Fórmulas: Sensibilidade:  $a/(a+c) \times 100$

Especificidade:  $d/(b+d) \times 100$

Valor preditivo positivo:  $a/a+b$

Valor preditivo negativo:  $d/c+d$

Acurácia:  $(a+d)/(a+b+c+d)$

#### **4.4. Determinação do gradiente de coloração**

Com a finalidade de diminuir o custo e facilitar a leitura para as localidades na qual não tenha um leitor de microplacas, foi criada um gradiente de cor com a placa freada com  $H_2SO_4$  e com a placa sem frear. Para determinação do gradiente de cor foram avaliadas as densidades ópticas das amostras comprovadamente negativas e amostras comprovadamente positivas, na qual se calculou a média de densidade óptica e variação no tom da cor.

#### **4.5. 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.

### 3. RESULTADOS

#### Com relação à diluição do antígeno

Os resultados obtidos no estudo da diluição do antígeno foram satisfatórios para todas as diluições com destaque e definição para as diluições do antígeno em 1:800 e 1:1600 e 100 microlitros das respectivas diluições distribuído por poço. Na titulação do antígeno por não haver diferença significativa entre as diluições, o critério de escolha obedeceu à utilização da menor quantidade de antígeno por teste realizado. A diluição escolhida foi a de 1:1600 para diluição do antígeno e 100 microlitro por poço da referida diluição conforme se observa na Figura 7.

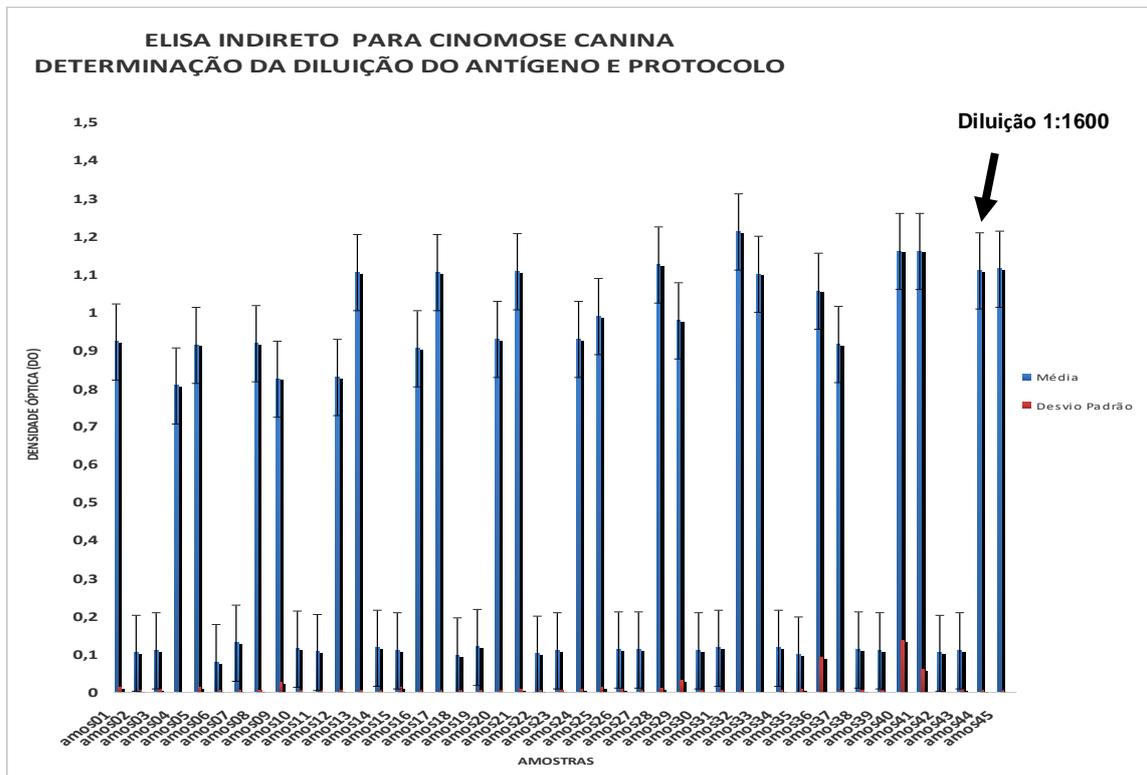


Figura 7: Resultados da titulação do antígeno utilizado para padronização do ELISA indireto para o diagnóstico da cinomose canina. Nessa etapa foi determinado também diluição do conjugado e diluição da amostra teste, sendo o conjugado 1:15.000 e soro teste 1:200.

**Com relação às amostras positivas e negativas para estudo do ponto de corte, sensibilidade e especificidade.**

As amostras comprovadamente positivas tiveram valores de densidade óptica oscilando entre 0,688 e 1,077. Observou-se que duas amostras apresentaram

valores de densidade óptica diferente do total de amostras submetidas ao teste, oscilando entre 0,168 e 0,153, Figura 8.

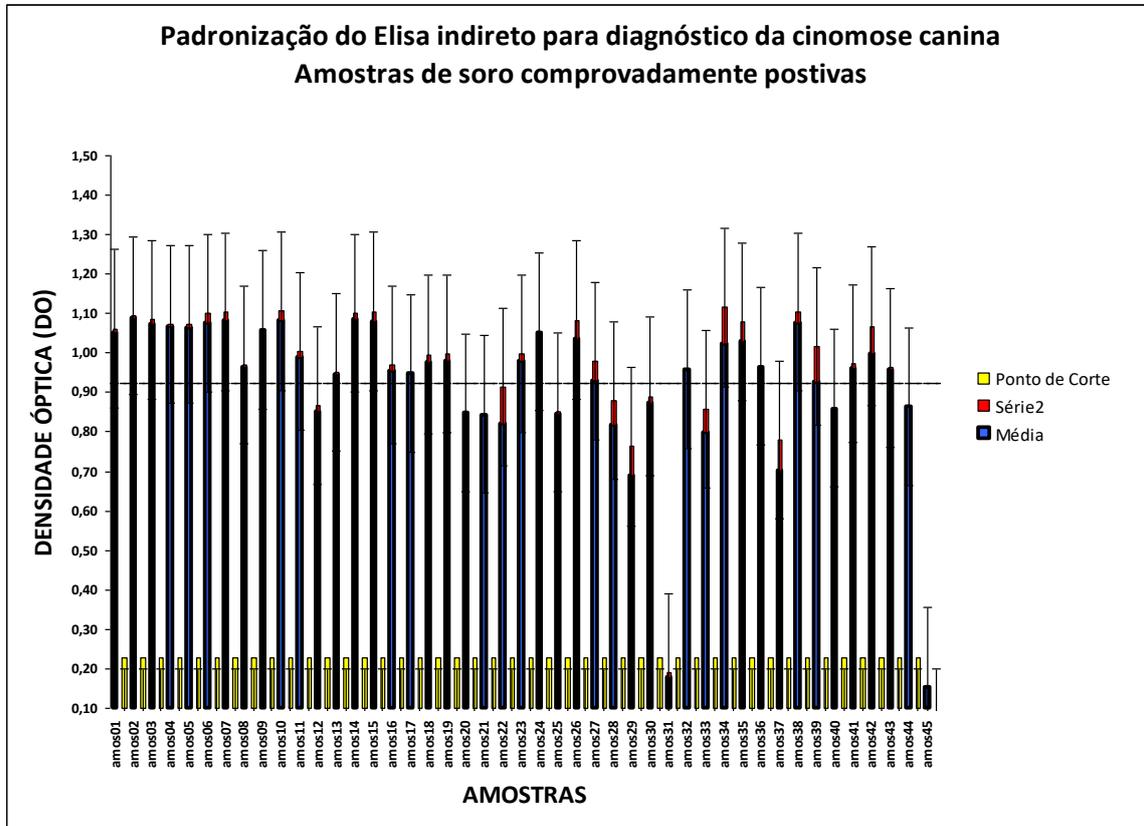


Figura 8: Resultados do teste ELISA indireto aplicado em amostras de cães diagnosticados como positivos para cinomose canina clínica e sorologicamente utilizando um teste ELISA comercial.

Na placa na qual foram testados 45 soros dos animais diagnosticados negativos, obteve-se sete amostras com densidade óptica oscilando entre 0,629, e 0,950, considerados diferentes das demais amostras que apresentaram densidade óptica oscilando entre 0,063 e 0,116, Figura 9.

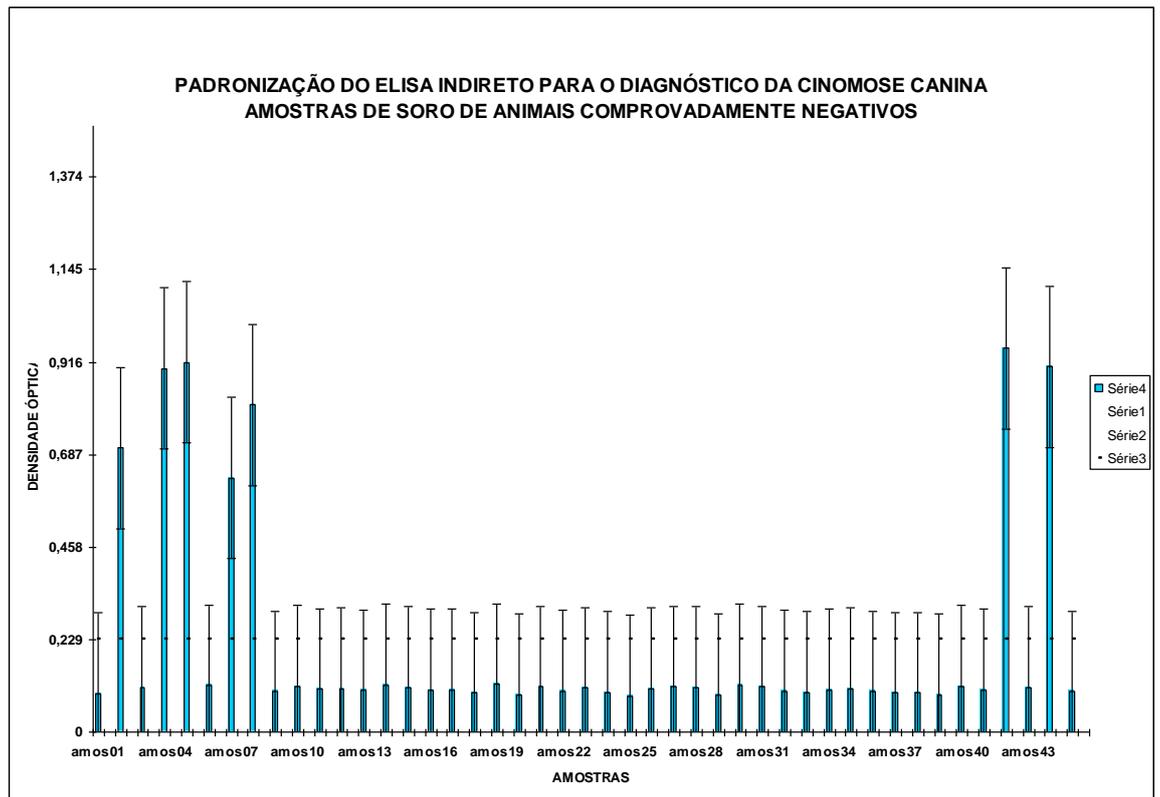


Figura 9: Resultados do teste ELISA indireto aplicado em amostras de cães diagnosticados clínica e sorologicamente negativos para cinomose canina.

Para validação do teste foram calculados os valores do ponto de corte, sensibilidade e especificidade. O ponto de corte determinado com a variação da densidade óptica das amostras comprovadamente negativas foi o valor de 0,229. Com relação a sensibilidade e especificidade obteve-se resultados de 95,5% e 84,4% respectivamente, fórmula abaixo:

Sensibilidade:  $a/(a+c) = 43/(43+2) \times 100 = 95,6\%$

Especificidade:  $d/b+d = 38/(7+38) \times 100 = 84,4\%$

Valor preditivo positivo:  $a/a+b \times 100 = 86\%$

Valor preditivo negativo:  $d/c+d \times 100 = 95\%$

Acurácia:  $(a+d)/(a+b+c+d) = (43+38)/(43+7+2+38) = 0,9$

Com relação a determinação dos gradientes de cor para leitura dos resultados sem utilização do leitor de microplacas para leitura sem frear com  $H_2SO_4$ , foram obtidos três tons de cores para cada padrão de densidade óptica com amostras comprovadamente negativas e placas comprovadamente positivas, conforme Figuras 10 e 11. Observa-se que a densidade óptica apresentaram valores que oscilaram com os tons de coloração entre 0,099 e 0,119, correspondendo a margem de possibilidades de animais negativos. Verifica-se também que os valores que oscilam em 0,120 e 0,228 correspondem a valores muito próximos do ponto de corte o que representa valores intermediários, provavelmente por se tratar de amostras que ainda não tenham uma quantidade suficiente de anticorpos para tornar a reação positiva ou talvez sejam amostras suspeitas, Figura 10.

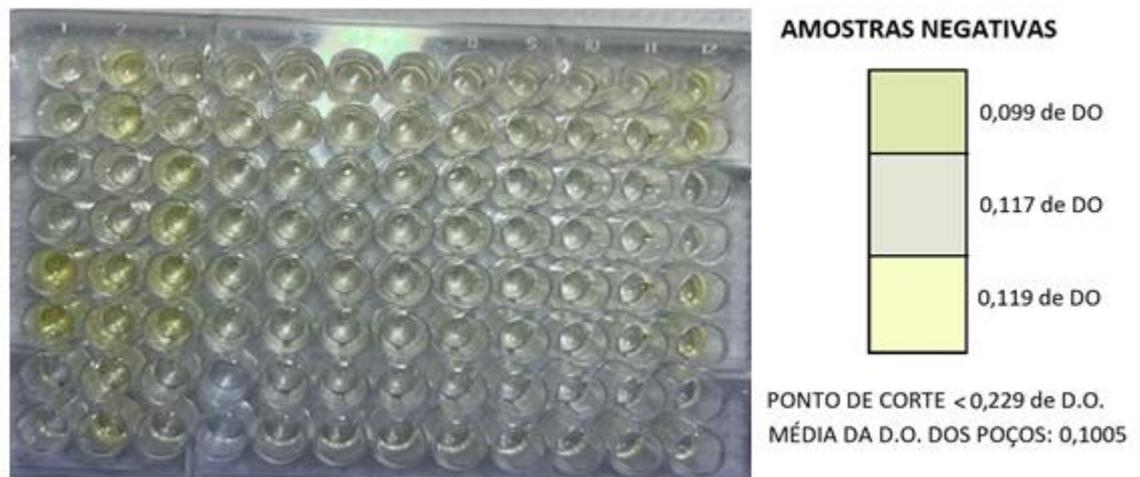


Figura 10- Amostras de soro canino de animais comprovadamente negativos para cinomose canina. Amostras submetidas ao ELISA indireto sem frear com  $H_2SO_4$ .

Com relação às amostras comprovadamente positivas identifica-se que a densidade óptica apresentaram valores que oscilaram com os tons de coloração entre 0,229 e 1,055, correspondendo a margem de possibilidades de animais positivos, uma vez que quanto maior for a densidade óptica, mais intenso o tom do poço se apresentará, Figura 11.

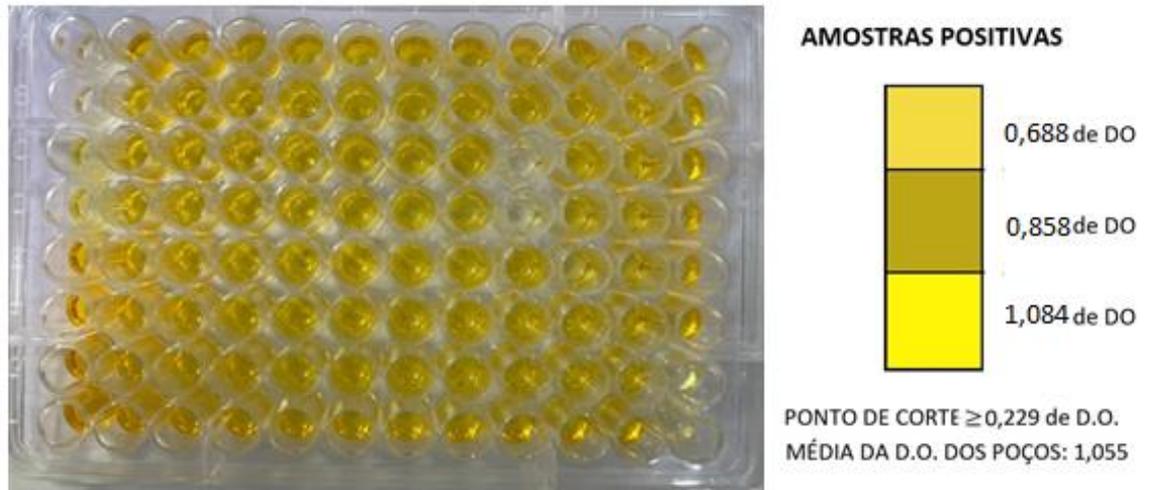


Figura 11- mostras de soro canino de animais comprovadamente positivos para cinomose canina. Amostras submetidas ao ELISA indireto sem frear com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Na avaliação do gradiente de cor de amostras comprovadamente negativas e amostras comprovadamente positivas com a placa freada com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, obteve-se os mesmos resultados de densidades ópticas constatados na leitura da placa sem frear, destacando a alteração nos tons dos valores identificados nas placas, uma vez que quanto maior for a densidade óptica, mais intenso o tom do poço se apresentará, Figuras 12 e 13.

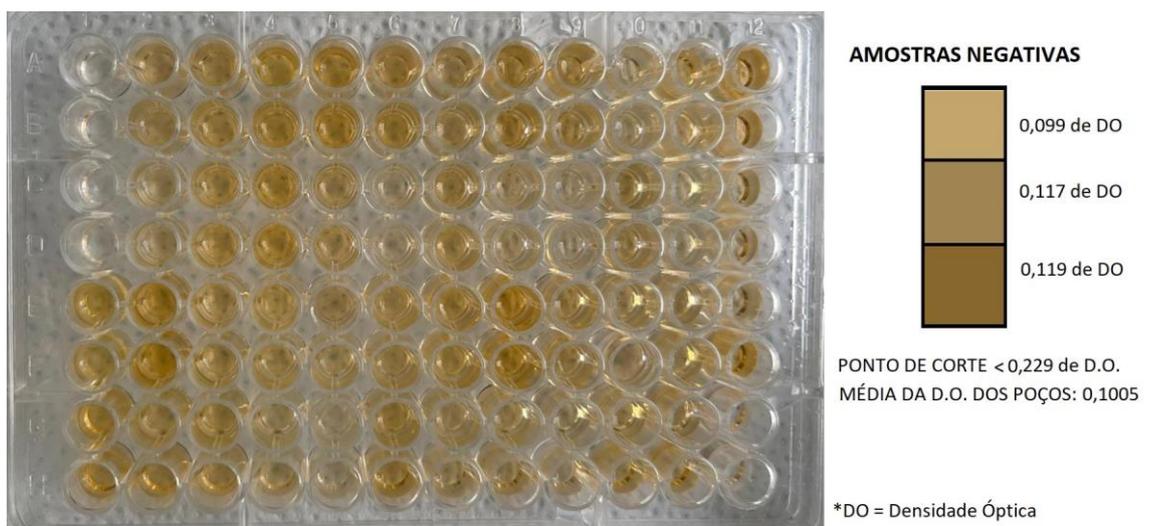


Figura 12- Amostras de soro canino de animais comprovadamente negativos para cinomose canina. Amostras submetidas ao ELISA indireto com freamento com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

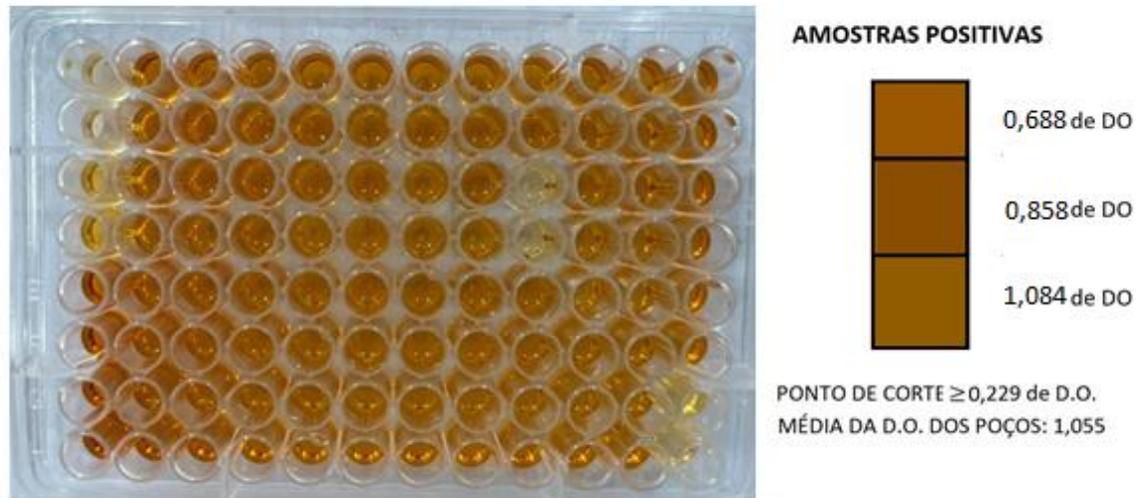


Figura 13- Amostras de soro canino de animais comprovadamente positivos para cinomose canina. Amostras submetidas ao ELISA indireto com freamento com  $H_2SO_4$ .

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

O teste foi aplicado em amostras sorológicas de populações de cães do bairro de Inocop da cidade de Cruz das Almas – Bahia (Figura 14), 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. Avaliando a leitura com o gradiente de cor, verifica-se que as amostras positivas apresentaram coloração equivalente ao padronizado nas figuras 12 e 13, assim como o gradiente das amostras que deram negativas.

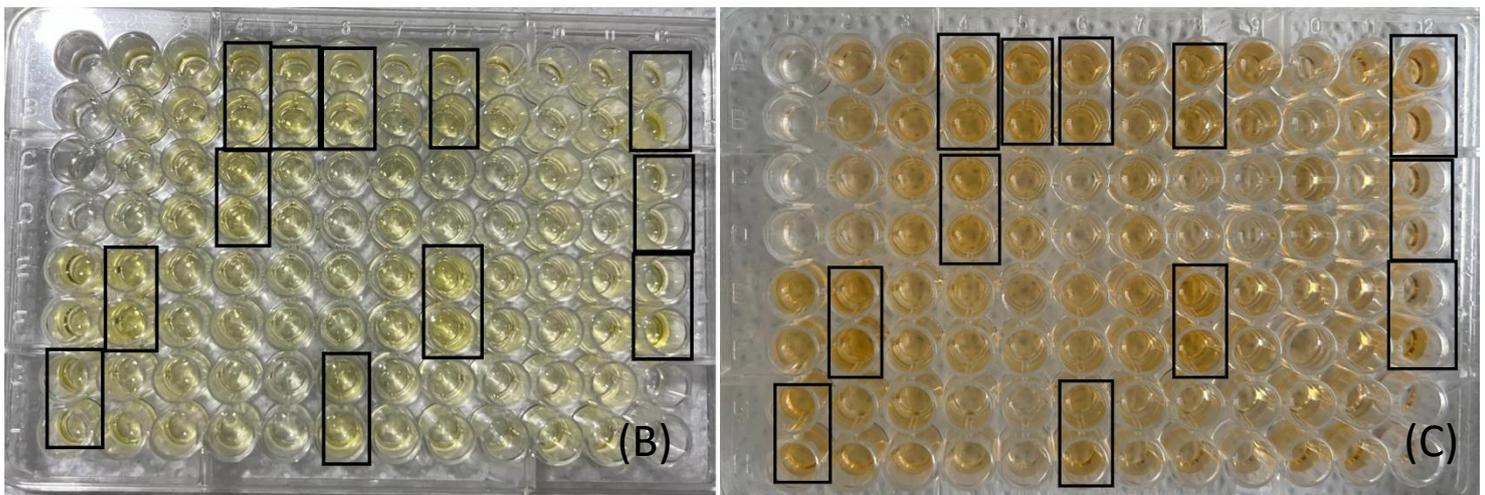
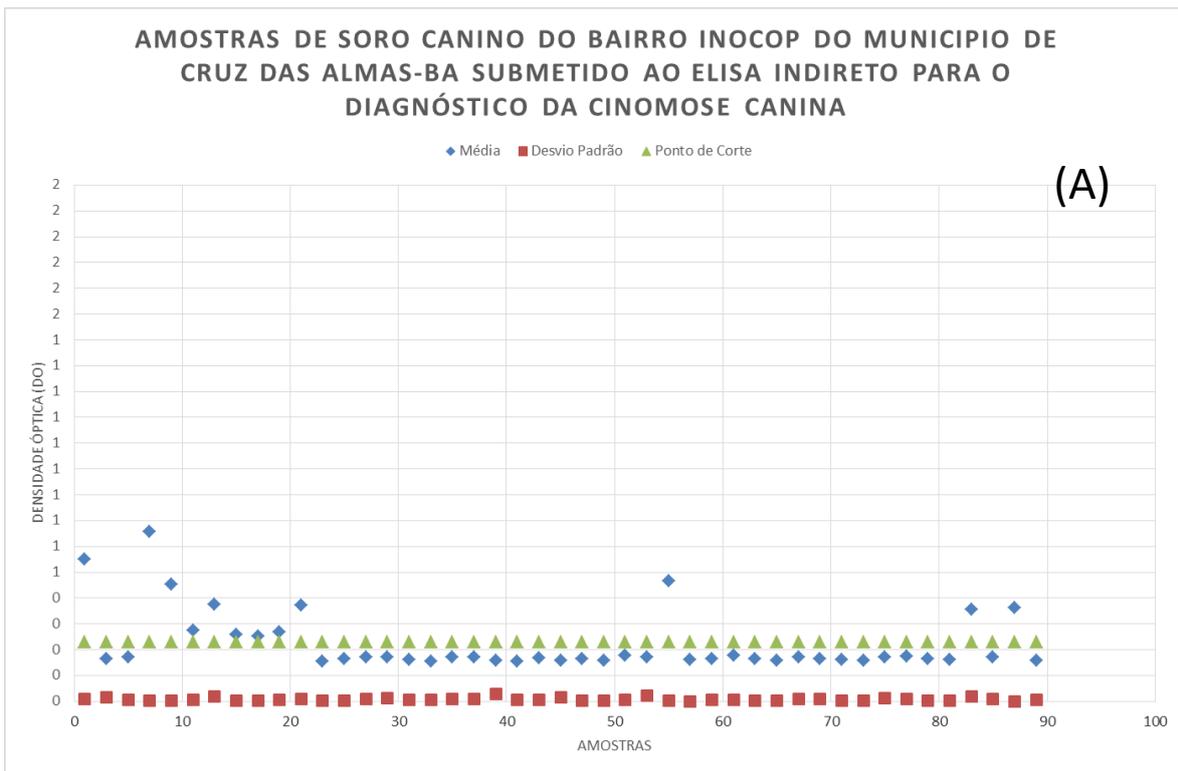


Figura 14: (A) Elisa indireto aplicado em amostras de soro canino do bairro Inocop em Cruz das Almas/Ba, ((B) – Reação sem frear, (C) – Reação freada

Amostras de um banco de soro canino dos bairros de Tabela e Inocop da cidade de Cruz das Almas – Ba (Figura 15), 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 nas figuras 11 e 12 das reações não freada e freada respectivamente.

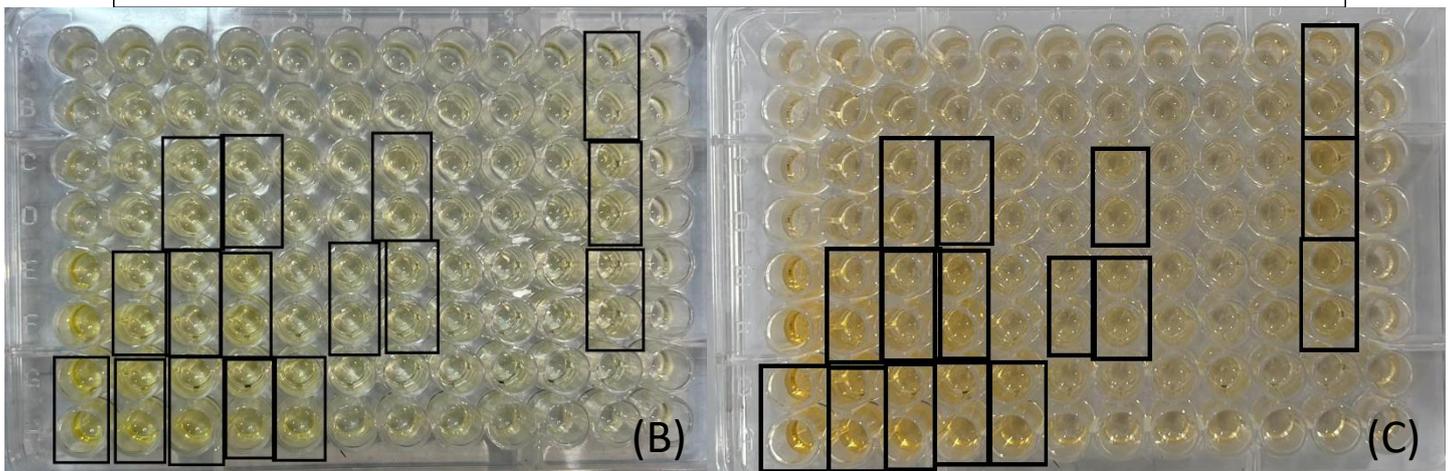
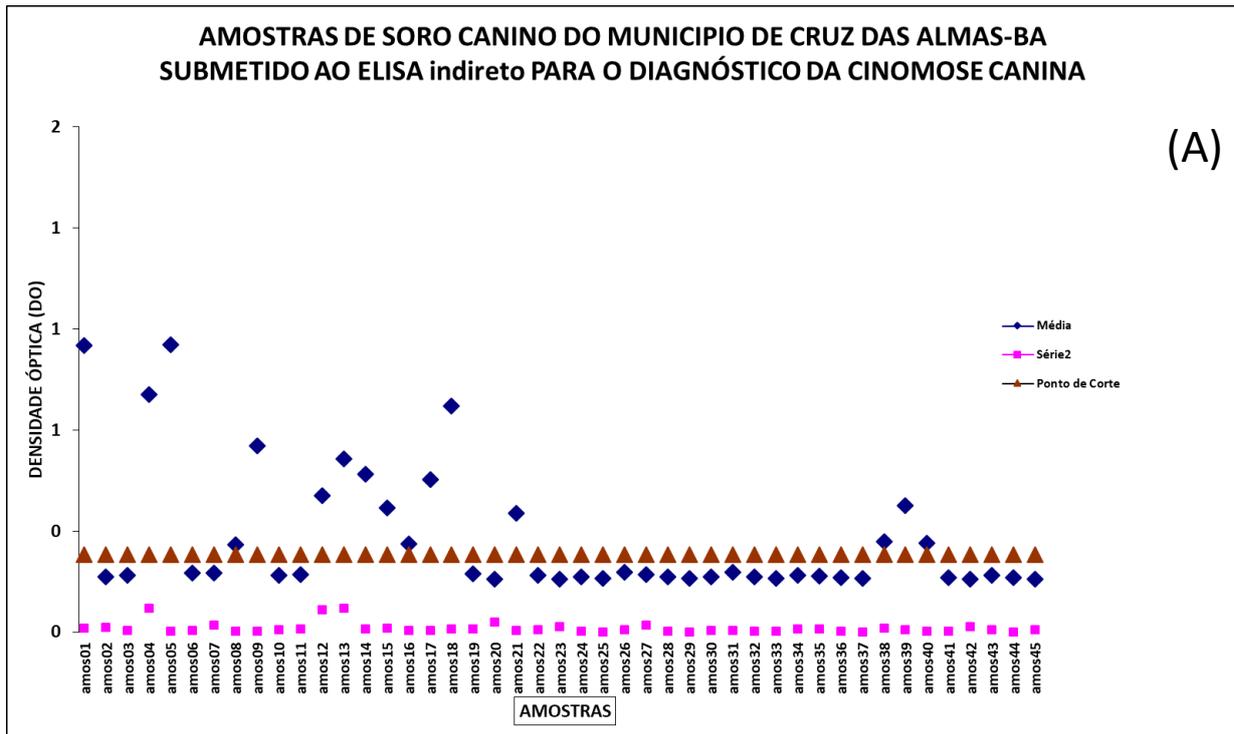


Figura 15: (A) Amostras de soro canino de animais da cidade de Cruz das Almas-Ba – Inocop e Tabela submetido ao teste ELISA indireto para o diagnóstico da cinomose canina, (B) – Reação sem frear, (C) – Reação freada.

Com relação às amostras de soros oriundas dos atendimentos no Hospital universitário de Medicina Veterinária da UFRB (Figura 16) 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 constatado que os valores corresponderam aos observados na

padronização descrita nas figuras 11 e 12 das reações não freada e freada respectivamente.

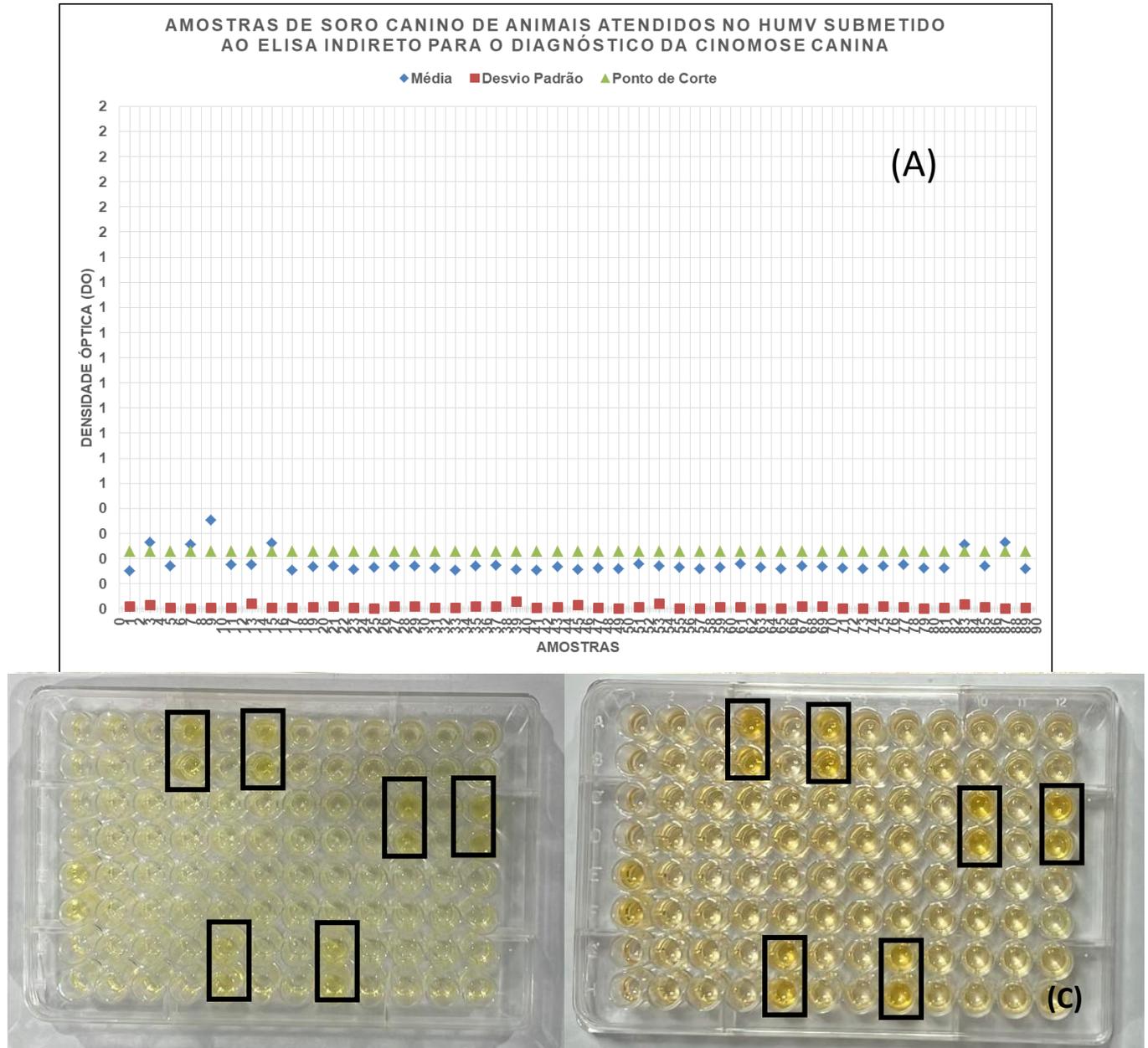


Figura 16: Elisa indireto aplicado em amostras de soro canino do HUMV- UFRB, (B) – Reação sem frear, (C) – Reação freada.

Foi realizado um teste ELISA indireto utilizando 45 amostras de um banco de soro de marsupiais (Figura 17), 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



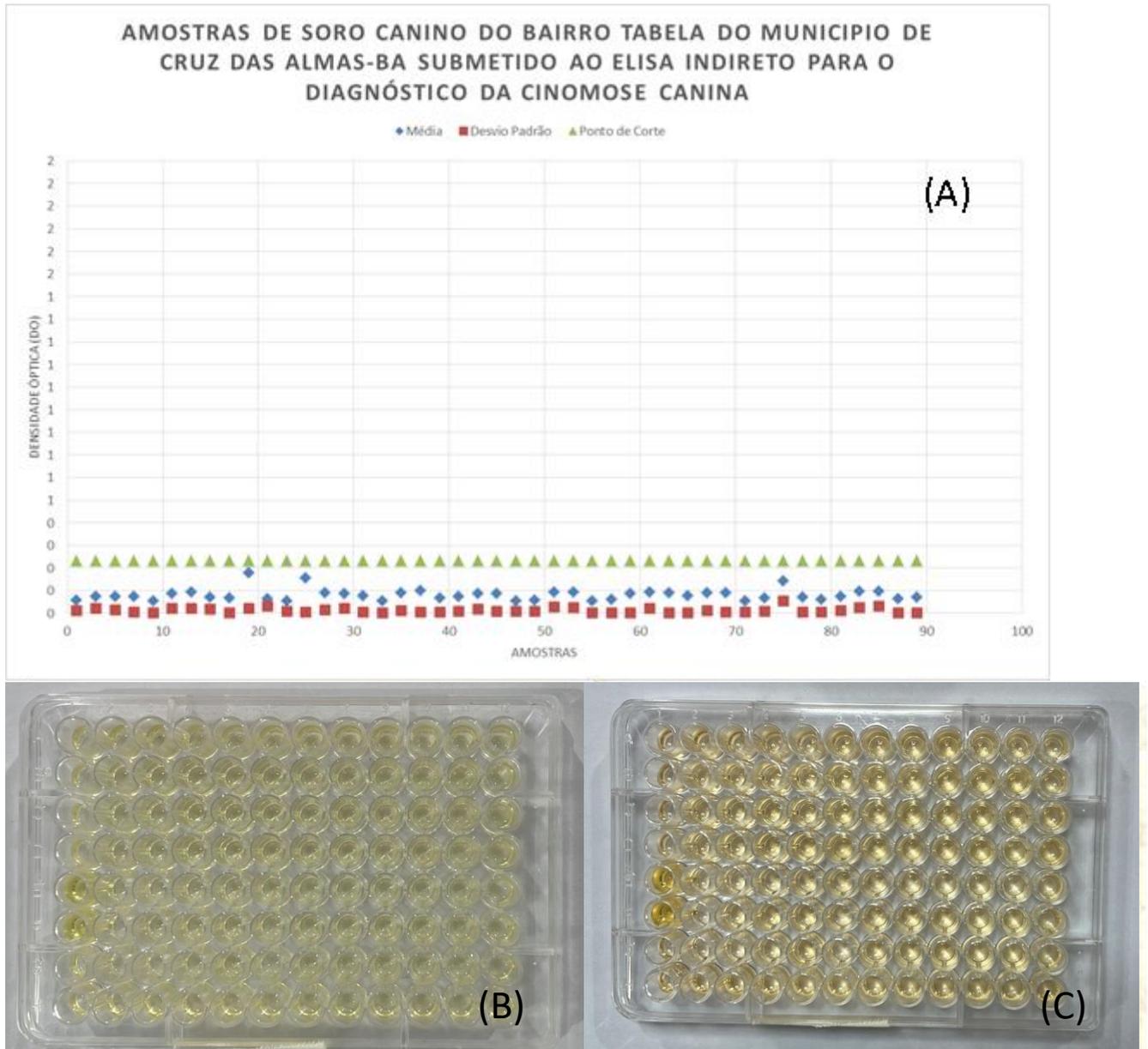


Figura 18: Elisa indireto aplicado em amostras de soro canino do bairro Tabela em Cruz das Almas – Bahia, (B) – Reação sem frear, (C) – Reação freada.

Os soros de primatas (Figura 19), do banco de soro de primatas do Laboratório de Doenças Infecciosas do Hospital Universitário de Medicina Veterinária 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 nas figuras 11 e 13, assim como o gradiente das amostras que deram negativas.

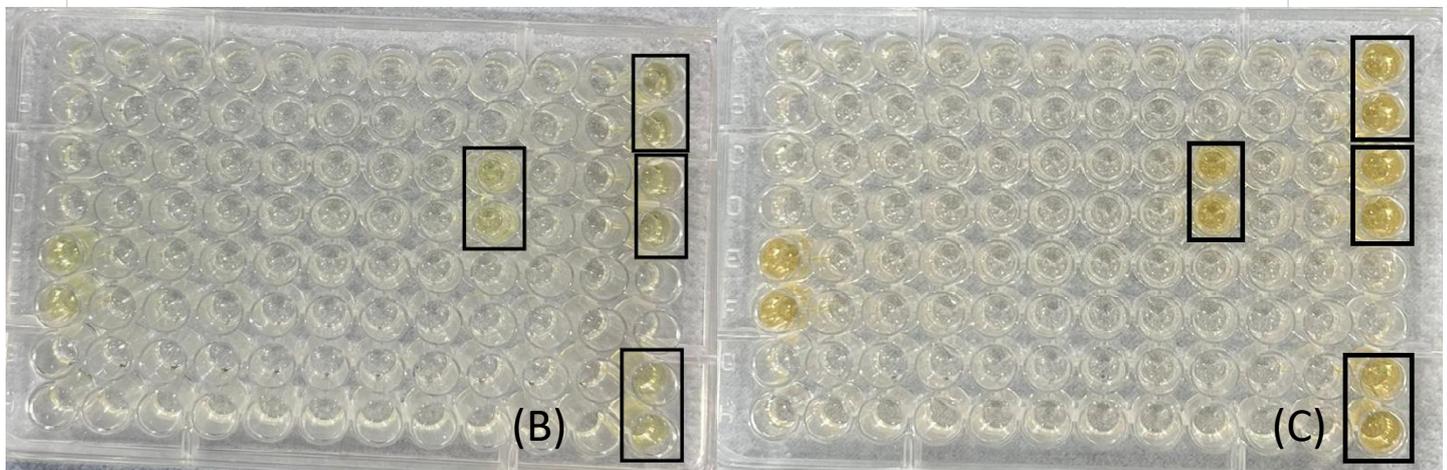
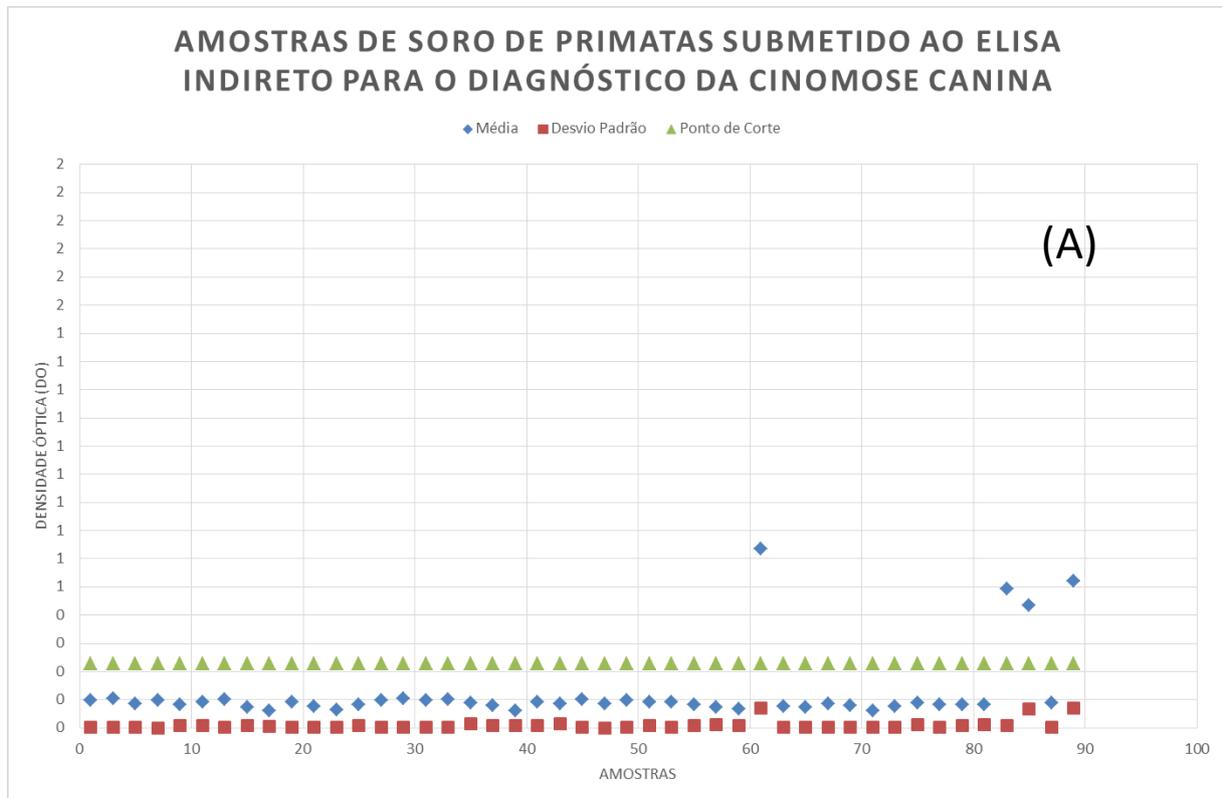


Figura 19: (A) Elisa indireto aplicado em amostras de soro de primatas, (B) – Reação sem frear, (C) – Reação freada

Ainda com relação ao banco de soro de primatas (Figura 20), nesta placa observou-se que 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 nas figuras 11 e 13, assim como o gradiente das amostras que deram negativas.

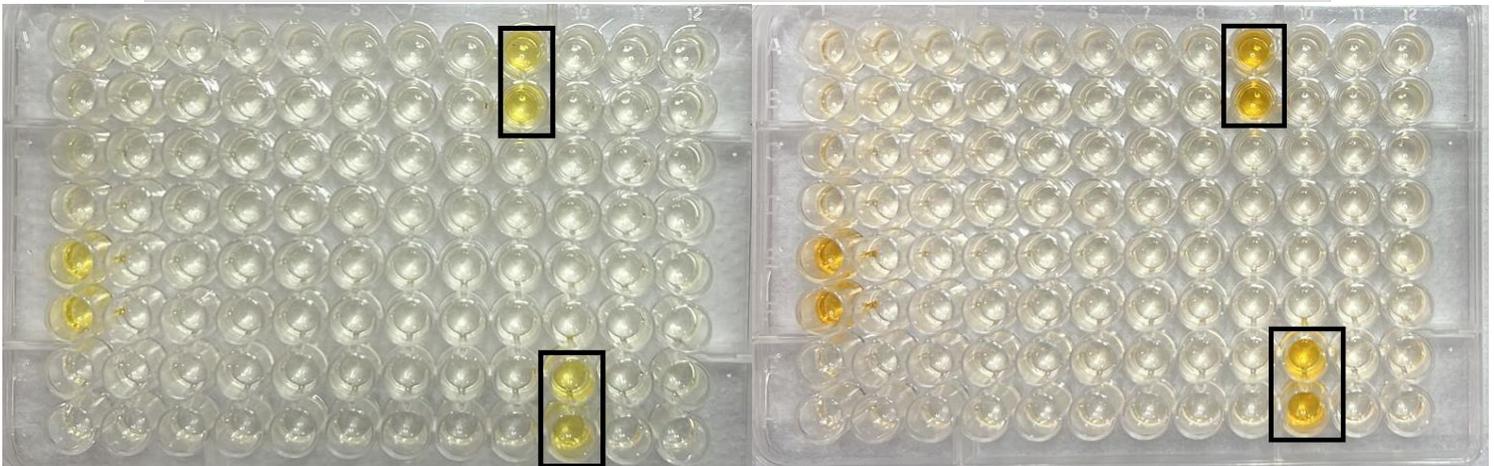
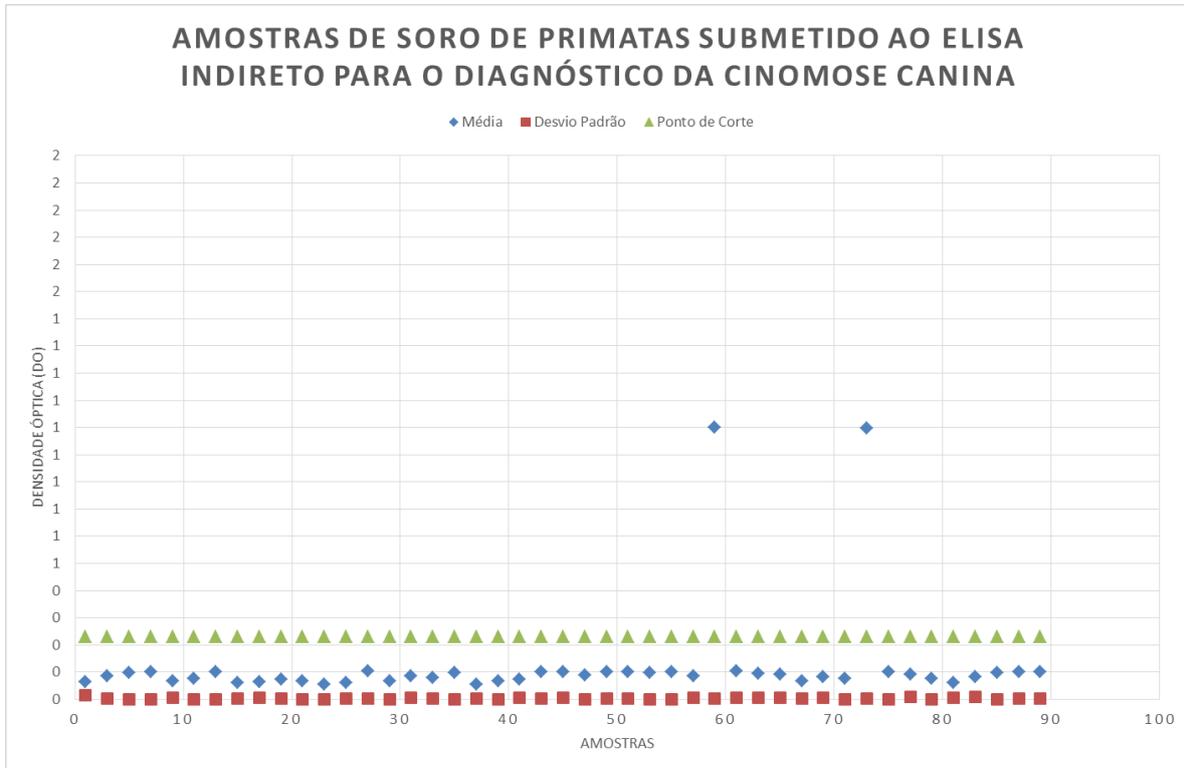


Figura 20: (A) Elisa indireto aplicado em amostras de soro de primatas. (B) – Reação sem frear, (C) – Reação freada.

#### 4. DISCUSSÃO

O teste estudado obteve 95,5% de sensibilidade e 84,4% de especificidade, o que é ideal para diagnosticar animais de fato positivos e possibilita um controle maior quanto aos animais negativos. Os animais testados devem ser avaliados clinicamente e através de exames laboratoriais para melhor constatação da doença. Em sua pesquisa, Magda Regina (1998), utilizou um antígeno semipurificado para a padronização de um ELISA indireto para o diagnóstico da cinomose e apresentou 61,76% de sensibilidade e 83% de especificidade. Resultados estes bons para detectar animais negativos, porém não muito confiáveis para detectar animais positivos, sua especificidade se aproximou dos resultados da pesquisa aqui apresentada, porém quanto à sensibilidade, o resultado se mostrou inferior ao mesmo. Uma vez que a sensibilidade demonstra a capacidade do teste de diagnosticar animais positivos, é de extrema importância o teste apresentar alta sensibilidade, para que os animais diagnosticados com positividade sejam tratados o mais rapidamente e que o teste não apresente grande quantidade de animais falso-negativos, sendo estes, animais infectados, porém negativos ao teste realizado.

Noon *et. al.*, em 1980, realizou um teste ELISA indireto para detecção da cinomose utilizando o antígeno sobrenadante e obteve 95,7% de sensibilidade e 98,1% de especificidade, sendo assim um resultado excelente para este teste para esta enfermidade, sendo sua sensibilidade apresentando valor semelhante ao encontrado nesta pesquisa, e especificidade ainda maior. A especificidade denota a capacidade do teste de diagnosticar animais negativos, é importante que a especificidade do teste seja alta para filtrar os animais negativos e tratar os animais diagnosticados como positivo, além de ser importante para que o teste apresente pouca quantidade de animais considerados “falso-positivos”, sendo estes, animais não infectados, porém positivos ao teste realizado.

Braz (2009) em sua pesquisa realizou um teste ELISA direto, teste este, que após a aplicar o antígeno na placa, o anticorpo é ligado a uma enzima como HRP e biotina para revelação do teste, possuindo menos etapas que o teste ELISA indireto, porém resultados semelhantes ao apresentado pelo presente trabalho quanto a

sensibilidade, quanto à especificidade, o ELISA direto apresentou melhor resultado que o ELISA indireto apresentado neste trabalho, em seu teste foram utilizadas amostras do epitélio nasal, conjuntiva e impressão da mucosa genital de 40 cães, e obteve sensibilidade de 93,8% e especificidade de 100% no teste. Apesar de serem testes semelhantes, o ELISA direto possui como objetivo detectar estruturas antigênicas do microrganismo, enquanto o ELISA indireto, detecta o anticorpo, por este motivo o ELISA direto demonstra melhores resultados e maior confiabilidade, apesar disso, os resultados do ELISA indireto aqui apresentado também apresenta bom desempenho com relação a sensibilidade e especificidade.

Conforme a padronização por uma empresa comercial (IDEXX®), de um ELISA considerando a avaliação pelo gradiente de cor na qual preconiza em seu guia uma explicação de que no teste ELISA indireto, os antígenos ficam revestidos na placa, o anticorpo da amostra (quando positivo), se adere entre o antígeno na placa e um conjugado de globulina antiespécie marcado com enzima. A adição do substrato enzimático-reagente cromógeno faz com que a cor se desenvolva nos poços, no qual o anticorpo está presente, e esta cor está diretamente proporcional à quantidade de amostra ligada ao anticorpo. Baseado nesta idéia estabeleceu-se para este trabalho uma leitura do ELISA padronizado baseado no gradiente de cor. Quanto mais anticorpo estiver presente na amostra, mais forte o desenvolvimento de cor nos poços do teste, e maior o resultado no valor de densidade óptica, quando a placa for lida em um leitor de placas. O gradiente de cor criado para esta pesquisa possibilita que laboratórios que não possuem o leitor de placas de ELISA consigam distinguir amostras positivas das negativas analisando as tabelas de gradiente de cor.

É possível analisar as amostras consideradas positivas nas figuras pelo gradiente de cor e confirmar sua positividade analisando conforme for se aproximando do apresentado nas figuras 10, 11, 12 e 13. Contudo, é importante está atento as imagens utilizadas por conta da nitidez e angulação de captura. No entanto, o uso do gradiente não compromete a leitura e interpretação logo após a revelação antes ou depois de frear como foi observado no presente trabalho. As placas apresentadas nesse trabalho foram tiradas de um aparelho celular, não

revelando de maneira 100% fiel à coloração capturada, mas ainda assim, não comprometeu a interpretação dos resultados.

A especificidade e a sensibilidade são parâmetros importantes para a definição de um teste Elisa indireto. Assim, quanto maior a sensibilidade do teste, maior a capacidade do teste negativo afastar a doença, pois diminui a probabilidade de falso negativo. Quanto maior a especificidade de um teste, maior a capacidade de o teste positivo detectar indivíduos doentes, pois diminui a probabilidade de falso positivo (LOPES, 2000). Os valores preditivos são aferições relacionadas ao desempenho de ensaios de diagnóstico. O valor preditivo positivo corresponde a probabilidade de existência da doença na presença de um teste positivo. O valor preditivo negativo corresponde a probabilidade de ausência da doença na presença de um teste negativo (FERREIRA e ÁVILA, 1996). O valor preditivo positivo do teste ELISA indireto padronizado foram calculados, para o ponto de corte definido, sendo de 86%. O valor preditivo negativo, para os pontos de corte definido, foram calculados em 95%. Com relação à acurácia, observou-se também um bom desempenho com concordância de 90%. Levando-se em consideração que a acurácia refere-se ao grau em que o teste ou uma estimativa baseada em um teste é capaz de determinar o verdadeiro valor do que está sendo medido, pode-se relatar que o teste ELISA padronizado consegue definir os indivíduos doentes e não doentes.

## 5. CONCLUSÃO

O teste ELISA indireto se mostrou com excelência como um teste de diagnóstico para a cinomose canina, obtendo-se um bom desempenho com relação à sensibilidade, especificidade, valores preditivos e acurácia, com isso, o teste consegue diagnosticar com segurança animais infectados e não infectados.

Com relação à padronização da leitura com o gradiente de cor criado, o teste demonstrou capacidade de diferenciar amostras de animais clinicamente positivos e de animais clinicamente negativos, bem como, animais suspeitos atendendo aos laboratórios que não apresentam o leitor de microplaca.

## REFERÊNCIAS

Alexander, J. C. (1995). **Fin de siècle social theory: Relativism, reduction, and the problem of reason**. Verso.

Alves, C. M., Vasconcelos, A. C., Martins, A. S., del Puerto, H. L., Santos, F. G. A., Nunes, J. E. S., ... & Moro, L. (2006). **Análise morfométrica do timo de cães filhotes infectados com a amostra Snyder Hill do vírus de cinomose canina**. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, 58, 472-479.

Amude A.M., Carvalho G.A., Alfieri A.A. & Alfieri A.F. 2007. **Virus isolation and molecular characterization of canine distemper virus by RT-PCR from a mature dog with multifocal encephalomyelitis**. Braz. J. Microbiol. 38:354-356.

Appel M.J.G., Reggiardo C., Summers B.A., Pearce-Kelling S., Maré C.J., Noon T.H., Reed R.E., Shively J.N. & Orvell C. 1991. **Canine distemper virus infection and encephalitis in javelinas (Collared peccaries)**. Arch. Virol. 119:147-152.

Arns, C.W.; Almeida, R.S.; Spilki, F.R.; Santos, M.B. Paramyxoviridae. In: Flores, E.F. (Ed.). **Virologia veterinária: virologia geral e doenças víricas**. 2ª ed. Santa Maria: Editora UFSM, 2012.

Axthelm, M.K., Krakowka, S. Canine distemper virus - induced thrombocytopenia. **American Journal of Veterinary Research**, v. 48, n. 8, p. 1269-75, 1987.

Barbosa, T. D. S., Vieira, R. F. D. C., Viol, M. A., Soeiro, C. S., Bomfim, S. R. M., & Ciarlini, P. C. (2011). Avaliação laboratorial da cinomose canina: estudo retrospectivo de 25 casos no município de Araçatuba-SP. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, 113-118.

Barbosa, T. D. S., Vieira, R. F. D. C., Viol, M. A., Soeiro, C. S., Bomfim, S. R. M., & Ciarlini, P. C. (2011). Avaliação laboratorial da cinomose canina: estudo

retrospectivo de 25 casos no município de Araçatuba-SP. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, 113-118.

Barbosa, T. D. S., Vieira, R. F. D. C., Viol, M. A., Soeiro, C. S., Bomfim, S. R. M., & Ciarlini, P. C. (2011). Avaliação laboratorial da cinomose canina: estudo retrospectivo de 25 casos no município de Araçatuba-SP. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, 113-118.

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.

Biazzono, L., Hagiwara, M. K., & Corrêa, A. R. (2001). Avaliação da resposta imune humoral em cães jovens imunizados contra a cinomose com vacina de vírus atenuado. **Brazilian journal of veterinary research and animal science**, 38, 245-250.

Bichard, S.J; Sherding, R.G. **Manual Saunders - Clínica de Pequenos Animais**, 2. ed, São Paulo: Roca, p. 117-120, 2003.

Braz, G. F. (2009). **Padronização e teste da técnica de imunofluorescência direta para o diagnóstico da cinomose canina.**

Carmichael, L. E. (1999). Canine viral vaccines at a turning point—a personal perspective. **Advances in veterinary medicine**, 41, 289.

Corrêa, C., & Corrêa, C. N. M. (1992). Cinomose. **Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos**. Rio de Janeiro, Medsi, 655-670.

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

Day, M. J.; Horzinek, M.C.; Schultz, R. D.; et al. Diretrizes para a vacinação de cães e gatos. **Journal of Small Animal Practice**, v. 57, 2016.

De Moraes, F. C., De Alvarenga Cruz, C., Meirelles-Bartoli, R. B., & de Sousa, D. B. (2013). Diagnóstico e controle da cinomose canina. **PUBVET**, 7, 1304-1450.

Dias, M. (2013). Cinomose canina: revisão de literatura. **Medicina Veterinária (UFRPE)**, 6(4), 32–40

Ferreira, A. W., Ávila S. L. M. **Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infeciosas e Auto-ímmunes**. Editora Guanabara-Koogan, p.1-6, 1996.

Freitas-Filho, E., Ferreira, M. R., Dias, M., & Moreira, C. (2014). Prevalência, fatores de risco e associações laboratoriais para Cinomose canina em Jatai-GO. **Enciclopédia Biosfera**, 10 (18).

Frey, A.; Di Canzio, J.; Zurakowski, D. A statistically defined endpoint titer determination method for immunoassays. **J. Immunological Methods**, n.221, p.35-41, 1998.

Gillespie, J. H., Baker, J. A., Burgher, J., Robson, D., & Gilman, B. (1958). The immune response of dogs to distemper virus. **Cornell Veterinarian**, 48, 103-126.

Gebara, C. M. S., Wosiacki, S. R., Negrão, F. J., Alfieri, A. A., & Alfieri, A. F. (2004). Lesões histológicas no sistema nervoso central de cães com encefalite e diagnóstico molecular da infecção pelo vírus da cinomose canina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 56, 168-174.

Gebara, C. M. S., Wosiacki, S. R., Negrão, F. J., De Oliveira, D. B., Beloni, S. N. E., Alfieri, A. A., & Alfieri, A. F. (2004). Detecção do gene da nucleoproteína do vírus da cinomose canina por RT-PCR em urina de cães com sinais clínicos de cinomose. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 56, 480-487.

- Greene C.E. & Appel M.J. 2006. Canine Distemper, p.25-41. In: Greene C.E. (ed.), **Infectious Diseases of the Dog and Cat. 3th ed. Elsevier, St Louis.** 1387p.
- Greene, C. E., & Vandeveld, M. (2015). Cinomose. **Doenças infecciosas em cães e gatos.** Guanabara Koogan.
- Headley, S. A. et al. Epidemiological features and the neuropathological manifestations of canine distemper virus-induced infections in Brazil: a review. **Semin. Ciênc. Agr., v.33, p.1945- 1978, 2012.**
- Hoskins J.D. Doenças Virais Caninas, p.440-441. In: Ettin-ger S.J. & Feldman E.C. (Eds), **Tratado de Medicina In-terna Veterinária.** Ed.5 Guanabara Koogan, São Paulo, 2004.
- Kajita, M; Katayama, H; Murata, T; Kai, C; Hori, M; Ozaki, H. Canine Distemper Virus induces apoptosis through Caspase-3 and -8 activation in Vero cells. **Journal Veterinary Medicine,** v. 53 p. 273 – 277, 2006.
- Laidlaw, P.P.; Dunkin, G.W. Studies in dog distemper: III .The nature of the virus. **Journal of Comparative Pathology,** v.29, p.222-230, 1926.
- Litfalla, F., Hamzé, A. L., Pacheco, A. M., Souza, C. C., Rodrigues, C. A. L. S., Filadelpho, A. L., & Bariani, M. H. (2008). Cinomose e o processo de desmielinização. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária,** Garças-SP, (11).
- Lopes, A. A., Tópicos de Metodologia da Pesquisa. 2000, 134p.
- Magda Regina (1998). **Produção de antígenos virais para detecção de anticorpos contra o vírus da cinomose canina.**
- Martins, D. B., dos Anjos Lopes, S. T., & França, R. T. (2009). Cinomose Canina- Revisão de Literatura. **Acta Veterinaria Brasilica,** 3(2), 68-76.

Moss W.J. & Griffin D.E. 2006. Global measles elimination. **Nat. Rev. Microbiol.** 4:900-908.

Negrão, F. J., Alfieri, A. A., & Alfieri, A. F. (2007). Avaliação da urina e de leucócitos como amostras biológicas para a detecção ante mortem do vírus da cinomose canina por RT-PCR em cães naturalmente infectados. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 59, 253-257.

Negrão, F. J., Wosiacki, S. H., Alfieri, A. A., & Alfieri, A. F. (2006). Perfil de restrição de um fragmento do gene da hemaglutinina amplificado pela RT-PCR a partir de estirpes vacinais e selvagens do vírus da cinomose canina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 58, 1099-1106.

Nelson, R.W., Couto, C.G. **Medicina Interna de Pequenos Animais**. Rio de Janeiro: Guanabara, 2 ed., 2001, p.1084.

Noon, K. F., Rogul, M., Binn, L. N., Keefe, T. J., Marchwicki, R. H., & Appel, M. J. (1980). Enzyme-linked immunosorbent assay for evaluation of antibody to canine distemper virus. **American Journal of Veterinary Research**, 41(4), 605-609.

Orsini, H., & Bondan, E. F. (2008). Participação astrocitária na desmielinização do sistema nervoso central (SNC) de cães com cinomose—revisão da literatura  
Astrocytic participation in the demyelinating process of the central nervous system (CNS) in canine distemper—a review. **Rev Inst Ciênc Saúde**, 26(4), 438-42.

Pain S. The plague dogs. **New Science** 1997; 154: 32-7.

Quinn, P.J., Markey, B.K., Carter, M. E., Donnelly, W.J., Leonard, F.C. (2005). **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. Porto Alegre: Artmed, 512p.

Sawatsky, B.; Von Messling, V. Canine distemper virus. In: KAMAL, S. K. (Ed.). **The Biology of Paramyxoviruses**. Norfolk: Caister Academic Press, 2011. p.275– 291.

Sherding, R. G. Cinomose. In: BIRCHARD, S. J., SHERDING, R. G., **Manual Saunders: clínica de pequenos animais**. 2 ed. São Paulo: Roca, p. 117-120, 2003.

Silva, W. I., do Nascimento Garrido, A. C., Ferreira, L. C., Silva, J. T., Batista, A. C., Ramos, M. E. O., ... & Vilela, V. L. R. (2021). Diagnóstico de cinomose canina por meio de teste imunocromatográfico e sua correlação com achados clínicos e hematológicos no semiárido da Paraíba. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, 28(1).

Soares A. N., Brandão E. C., Cunha G. F., Scherrer L. R., Precivale M., Strassmann P. G., Assis S. R. L. (2012) - **MANUAL DE CONDUTAS SBOC - Direitos reservados sboc - Capítulo 5 – Artigos sobre Testes Diagnósticos**.

Sonne, L., Oliveira, E. C., Pescador, C. A., Santos, A. S., Pavarini, S. P., Carissimi, A. S., & Driemeier, D. (2009). Achados patológicos e imuno-histoquímicos em cães infectados naturalmente pelo vírus da cinomose canina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 29, 143-149.

Sousa, R., Baião, J., Santos, J., Rocha, L., & Machado, L. (2015). **Achados Hematológicos Em Cães Com Cinomose Em Bom Jesus/Pi**. **Enciclopédia Biosfera**, 11(22).

Summers B.A., Cummings J.F. & De Lahunta A. 1995. **Veterinary Neuropathology**. Mosby, St Louis. 527p.

Tabanez, P. **Cinomose: há algo novo?**, acesso: [www.vetsmart.com.br/cg/estudo/13904/cinomose-ha-algo-de-novo](http://www.vetsmart.com.br/cg/estudo/13904/cinomose-ha-algo-de-novo), boletim técnico, empresa Boehringer Ingelheim. 2019.

Tatsuo H.; Ono N.; Tanaka K.; Yanagi Y. Slam (CDw150) is a cellular receptor for measles virus. **Nature**, v.406,p.893-897, 2000.

Thompson, D.J.; Sutton, J.B.; Chandler, E.A. **Medicina Terapêutica de Caninos**. São Paulo: Manole Ltda, Cap. 13, p. 387- 392, 1989.

Tizard, I. R. **Imunologia veterinária**. 6 ed. São Paulo: Roca, 2002. p.121.

Van de Bildt, M. W., Kuiken, T., Visee, A. M., Lema, S., Fitzjohn, T. R., & Osterhaus, A. D. (2002). Distemper outbreak and its effect on African wild dog conservation. **Emerging infectious diseases**, 8(2), 212.

Yoshikawa Y., Ochikubo F., Matsubara Y., Tsuruoka H., Ishii M., Shirota K., Nomura Y., Sugiyama M. & Yamanouchi K. 1989. Natural infection with canine distemper virus in a Japanese monkey (*Macaca fuscata*). **Vet. Microbiol.** 20:193-205.

Zee Y. C. Paramyxoviridae. In: HIRSH, D. C.; ZEE Y. C. **Microbiologia Veterinária**. Rio de Janeiro-RJ. Guanabara Koogan, 2003. Cap. 69, p. 374-382.

# ANEXO 1

Esse trabalho foi submetido à Revista Brasileira de Ciência Veterinária no dia 09 de Junho de 2022 (processo 54840), conforme artigo em anexo.

## **PADRONIZAÇÃO DE UM TESTE ELISA INDIRETO PARA DIAGNÓSTICO DA CINOMOSE CANINA**

### **STANDARDIZATION OF AN INDIRECT ELISA TEST FOR CANINE DISEASE DIAGNOSIS**

Bruno Passos Fernandes<sup>1</sup>, Robson Bahia Cerqueira<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Graduando em Medicina Veterinária pela Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.

<sup>2</sup>Professor Doutor na Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.

### **RESUMO**

A cinomose é uma enfermidade causada pelo vírus Canine Distemper Virus (CDV). Essa doença afeta principalmente cães, mas também acomete outras espécies domésticas e selvagens. A imunidade do animal está relacionada ao grau que a esse patógeno vai atingir o organismo do indivíduo. Ela afeta a respiração do animal, pode causar vômito, diarreia, convulsões, podendo levar o animal à óbito. O objetivo do presente trabalho foi padronizar um teste ELISA indireto para diagnosticar cinomose em cães utilizando um antígeno de superfície. Para padronização da técnica, fez-se necessário o estudo da diluição do antígeno para identificar a melhor concentração para sensibilização da placa. O teste foi aplicado primeiramente com diferentes diluições do antígeno para detecção do melhor desempenho do antígeno. Feito isso, foi testado em um banco de soro de 45 animais comprovadamente

negativos no teste ELISA comercial e em soro de 45 animais comprovadamente negativos no teste ELISA comercial, posteriormente foi calculado o ponto de corte, especificidade e sensibilidade do teste. O teste ELISA indireto se mostrou com excelência como um teste de diagnóstico para a cinomose canina, obtendo-se ponto de corte de densidade óptica de 0,229, sensibilidade de 95,5% e especificidade de 84,4%.

**Palavras Chaves: CDV, Enfermidades Infecciosas, Imunodiagnóstico.**

### **ABSTRACT**

Distemper is a disease or the disease by the CDV virus, Distemper Virus. This disease mainly affects dogs, but also affects other domestic and wild species. The animal's immunity is related to the degree to which it will reach the individual's organism. It affects the animal's breathing, can cause vomiting, diarrhea, convulsions, and can lead to death. The aim of the present work test was to standardize an indirect ELISA for distemper diagnosis in experiments using a surface antigen. For the study of technical identification, it was necessary to specify the antigen for the best concentration of plaque sensitization. The test was initially applied with different dilutions of the antigen to detect the best performance of the antigen. This was tested in a serum bank of 45 animals demonstrably in the commercially approved ELISA test in the 45 animal ELISA test demonstrably denied in the commercial serum ELISA, later it was tested on the cut-off point, specificity and sensitivity of the test. The indirect ELISA test proved to be excellent as a diagnostic test for canine distemper, with an optical density cut-off of 0.229, sensitivity of 95.5% and specificity of 84.4% being obtained.

**Key Word:** CDV, Infectious Diseases, Immunodiagnosis.

## INTRODUÇÃO

A cinomose é uma enfermidade causada pelo vírus *Canine Distemper Virus (CDV)*. Essa doença afeta principalmente cães, mas também acomete outras espécies domésticas e selvagens. A imunidade do animal está relacionada ao grau que a esse patógeno vai atingir o organismo do indivíduo. 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). 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 consequentemente 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). 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 padronizar um teste ELISA indireto para o diagnóstico da cinomose em cães utilizando um antígeno de superfície.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### **Características do antígeno, diluições e determinação do protocolo ELISA indireto**

O antígeno foi cedido gentilmente pelo Laboratório de Doenças Infecciosas do Hospital Veterinário da UNIME- Lauro de Freitas-Ba. O isolado Snyder Hill (ATCC VR-526 – Manassas, EUA) do vírus da cinomose foi utilizado como antígeno para testes imunodiagnósticos. O vírus foi propagado em células MDCK na 255ª passagem e mantido em Meio Essencial Mínimo (Cultilab), suplementado com 0,2g/L de estreptomicina, 0,15g/L de penicilina G potássica e 10% SFB, em pH 7,2. A 3ª passagem do vírus nestas células foi alicotada e armazenada em temperatura -18°C. A caracterização desse antígeno foi considerada como proteínas de superfície.

### **Diluição do antígeno e determinação do protocolo ELISA indireto**

Para determinar a concentração de antígeno a ser utilizado no teste ELISA indireto para diagnóstico da cinomose em cães, foi sensibilizada uma placa de poliestileno com 96 poços (KASVI), utilizando tampão carbonato-bicarbonato e diferentes diluições do antígeno, sendo na coluna 1 e 2, 1:50, na coluna 3 e 4, 1:100, na coluna 5 e 6, 1:200, na coluna 7 e 8, 1:400, na coluna 9 e 10, 1:800, e na coluna 11 e 12, 1:1600, conforme a **FIGURA 1**.

A placa foi 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 o branco (meio de diluição do soros - fileira A e B), soro comprovadamente negativo (fileiras C e D), soro comprovadamente positivo (fileiras E e F) e soro teste (fileiras G e H). 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 volume) + 60mg de

OPD). A reação foi freada com ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) e lida no espectrofotômetro com filtro de 492 nm.

### **Amostras submetidas à padronização**

O respectivo teste foi aplicado em 90 amostras de soro canino, sendo 45 mostras de animais comprovadamente negativos e 45 amostras de animais comprovadamente positivos. Essas amostras fazem parte de um banco de soro armazenado no laboratório de Doenças Infecciosas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB). Foram utilizadas amostras de animais clinicamente positivos e animais clinicamente negativos submetidos a exames laboratoriais e sorologia de kit comercial para pesquisa de anticorpo chamado de Accuvet CDV/CPV Ac Test. Esse kit apresenta desempenho de sensibilidade e especificidade de 99,10% e 98% respectivamente.

### **Estudo do Ponto de corte, sensibilidade e especificidade**

O ponto de corte foi determinado através do cálculo da média de animais não reagentes acrescido de três vezes o desvio padrão populacional baseado em FREY, *et. al.*, (1998). Abaixo as fórmulas utilizadas para realização do cálculo da sensibilidade, especificidade e ponto de corte para o teste padronizado.

**Ponto de corte** = Média aritmética de não reagentes + 3 • Desvio padrão populacional

Para validação do teste foram calculados os valores de sensibilidade e especificidade de acordo estudo realizado por FREY *et. al.*, 1998.

$$\text{— Sensibilidade} = \frac{\text{Doentes detectados pelo teste}}{\text{Total de doentes testados}} \cdot 100$$

$$\text{— Especificidade} = \frac{\text{Sadios negativos no teste}}{\text{Total de doentes testados}} \cdot 100$$

### **Determinação do gradiente de coloração**

Com a finalidade de diminuir o custo e facilitar a leitura para as localidades na qual não tenha um leitor de microplacas, foi criada um gradiente de cor com a placa freada com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e com a placa sem frear. Para determinação do gradiente de cor foram avaliadas as densidades

ópticas das amostras comprovadamente negativas e amostras comprovadamente positivas, na qual se calculou a média de densidade óptica e variação no tom da cor.

## RESULTADOS

### Com relação a diluição do antígeno

Os resultados obtidos no estudo da diluição do antígeno foram satisfatórios para todas as diluições com destaque e definição para as diluições do antígeno em 1:800 e 1:1600 e 100 microlitros das respectivas diluições distribuído por poço. Na titulação do antígeno por não haver diferença significativa entre as diluições, o critério de escolha obedeceu à utilização da menor quantidade de antígeno por teste realizado. A diluição escolhida a de 1600 para diluição do antígeno e 100 microlitro por poço da referida diluição conforme se observa na **FIGURA 2**.

### Com relação as amostras positivas e negativas para estudo do ponto de corte, sensibilidade e especificidade.

Para validação do teste foram calculados os valores do ponto de corte, sensibilidade e especificidade. O ponto de corte determinado com a variação da densidade óptica das amostras comprovadamente negativas, estabelecendo o valor de 0,229. Com relação a sensibilidade e especificidade obteve-se resultados de 95,5% e 84,4% respectivamente, fórmula abaixo:

$$\text{— Sensibilidade} = \frac{43}{45} \cdot 100 = 95,5\%$$

$$\text{— Especificidade} = \frac{38}{45} \cdot 100 = 84,4\%$$

As amostras comprovadamente positivas tiveram valores de densidade óptica oscilando acima do ponto de corte como 0,688 e 1,077. Considerando o ponto de corte de

0,229 das 45 amostras comprovadamente positiva, duas apresentaram valores de densidade óptica abaixo do ponto de corte, oscilando entre 0,168 e 0,153, **FIGURA 3**.

Na placa na qual foram testados 45 soros dos animais diagnosticados negativos, obtive-se sete amostras com densidade óptica oscilando entre 0,629, e 0,950, considerados falso-positivos. As demais amostras comprovadamente negativas apresentaram densidade óptica oscilando entre 0,063 e 0,116, valores abaixo do ponto de corte, **FIGURA 4**.

Com relação a determinação dos gradientes de cor para leitura dos resultados sem utilização do leitor de microplacas para leitura sem frear com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, foram obtidos três tons de cores para cada padrão de densidade óptica com amostras comprovadamente negativas e placas comprovadamente positivas, conforme **FIGURAS 5 e 6**.

Observa-se que a densidade óptica apresentaram valores que oscilaram com os tons de coloração entre 0,099 e 0,119, correspondendo a margem de possibilidades de animais negativos. Verifica-se também que os valores que oscilam em 0,120 e 0,228 correspondem a valores muito próximos do ponto de corte o que representa valores intermediários, provavelmente por se tratar de amostras que estejam próximas a positividade, mas que ainda não sejam totalmente positivas.

Com relação às amostras comprovadamente positivas identifica-se que a densidade óptica apresentaram valores que oscilaram com os tons de coloração entre 0,229 e 1,055, correspondendo a margem de possibilidades de animais positivos.

Na avaliação do gradiente de cor de amostras comprovadamente negativas e amostras comprovadamente positivas com a placa freada com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, obteve-se os mesmos resultados de densidades ópticas constatados na leitura da placa sem frear, destacando a alteração nos tons dos valores identificados nas placas, **FIGURAS 7 e 8**.

## DISCUSSÃO

O teste estudado obteve 95,5% de sensibilidade e 84,4% de especificidade, o que é ideal para diagnosticar animais de fato positivos e pode-se ter um controle maior quanto aos animais negativos, sendo depois de testados no ELISA indireto, os animais testados devem ser avaliados clinicamente e através de exames bioquímicos para melhor constatação da doença. Em sua pesquisa, Magda Regina (1998), utilizou um antígeno semipurificado, para a padronização de um ELISA indireto apresentou e 61,76% de sensibilidade e 83% de especificidade, resultados estes bons para detectar animais negativos, porém não confiáveis para detectar animais positivos, sua especificidade se aproximou dos resultados da pesquisa aqui apresentada, porém quanto à sensibilidade, o resultado se mostrou inferior ao mesmo. Uma vez que a sensibilidade demonstra a capacidade do teste de diagnosticar animais realmente infectados, é de extrema importância o teste apresentar alta sensibilidade, para que os animais diagnosticados com positividade sejam tratados o mais rapidamente e que o teste não apresente grande quantidade de animais falso-negativos, sendo estes, animais infectados, porém negativos ao teste realizado. Noon *et. al.*, em 1980, realizou um teste ELISA indireto para detecção da cinomose utilizando o antígeno sobrenadante e obteve 95,7% de sensibilidade e 98,1% de especificidade, sendo assim um resultado excelente para este teste para esta enfermidade, sendo sua sensibilidade apresentando valor semelhante ao encontrado nesta pesquisa, e especificidade ainda maior. A especificidade denota a capacidade do teste de diagnosticar animais negativos, é importante que a especificidade do teste seja alta para filtrar os animais negativos e tratar os animais diagnosticados como positivo, além de ser importante para que o teste apresente pouca quantidade de animais considerados “falso-positivos”, sendo estes, animais não infectados, porém positivos ao teste realizado. Braz (2009) em sua pesquisa, realizou um teste ELISA direto, teste este, que após a aplicar o antígeno na placa, o anticorpo é ligado a uma enzima como HRP e biotina para revelação do teste, possuindo menos etapas que o teste ELISA indireto, porém resultados semelhantes ao apresentado pelo presente trabalho quanto a sensibilidade, quanto à especificidade, o ELISA direto apresentou melhor resultado que o ELISA indireto apresentado neste trabalho, em seu teste foram utilizadas amostras do epitélio nasal, conjuntiva e impressão da mucosa genital de 40 cães, e obteve sensibilidade de 93,8% e especificidade de 100% no teste. Apesar de serem testes semelhantes, o ELISA direto possui como objetivo detectar estruturas antigênicas do microrganismo, enquanto o ELISA indireto, detecta o anticorpo, por este motivo o ELISA direto demonstra melhores resultados e maior confiabilidade, apesar disso, os resultados do

ELISA indireto aqui apresentado, não deixa a desejar quanto ao desempenho de sensibilidade e especificidade.

### **CONCLUSÃO**

O teste ELISA indireto se mostrou com excelência como um teste de diagnóstico para a cinomose canina, obtendo-se um bom desempenho com relação à sensibilidade e especificidade, com isso, o teste consegue diagnosticar com segurança animais infectados e não infectados. O mesmo consegue discriminar animais realmente infectados, possibilitando um tratamento da enfermidade de maneira mais assertiva. Com relação à padronização da leitura com o gradiente de cor criado, o teste demonstrou capacidade de diferenciar amostras de animais clinicamente positivos e de animais clinicamente negativos atendendo aos laboratórios que não apresentam o leitor de microplaca.

### **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.
- 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 evaluation 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.

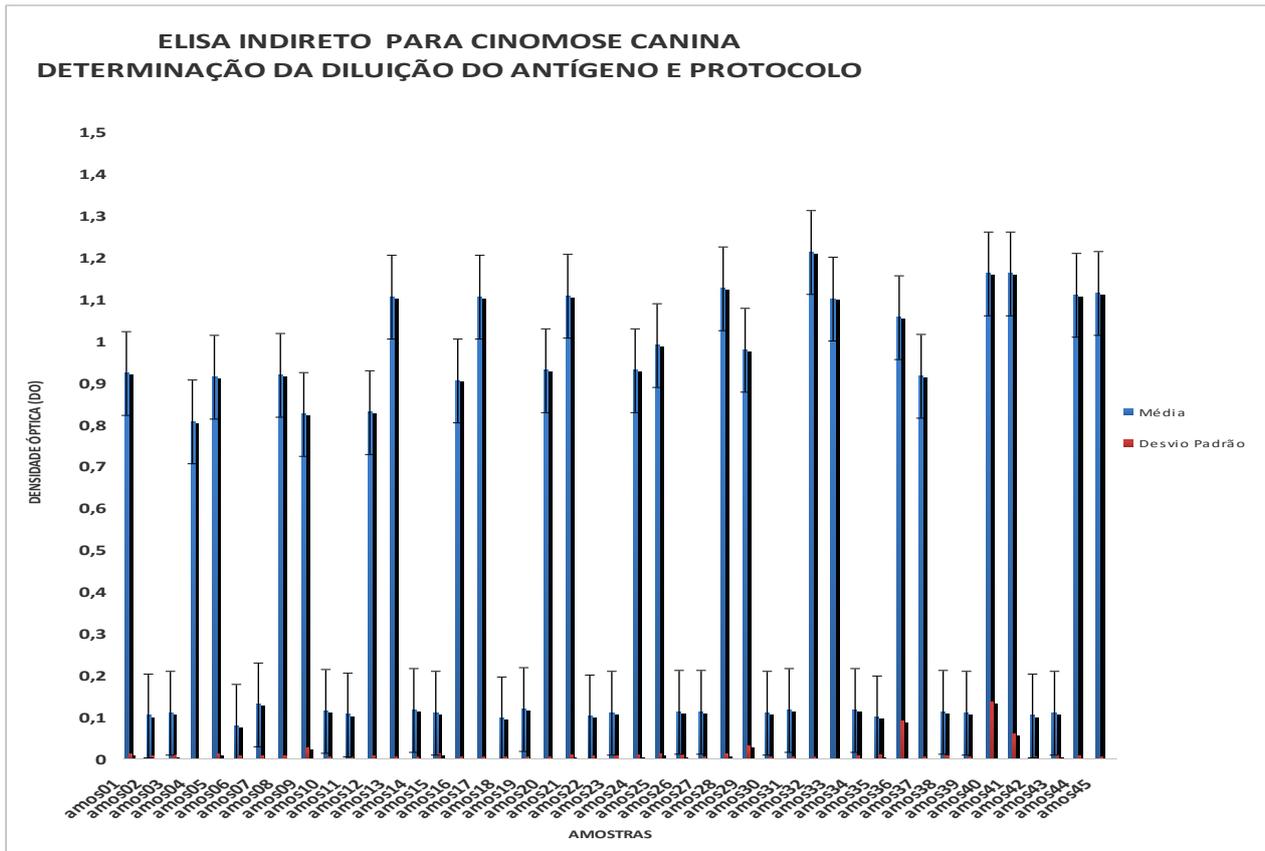
## FIGURAS

### TITULAÇÃO DO ANTÍGENO

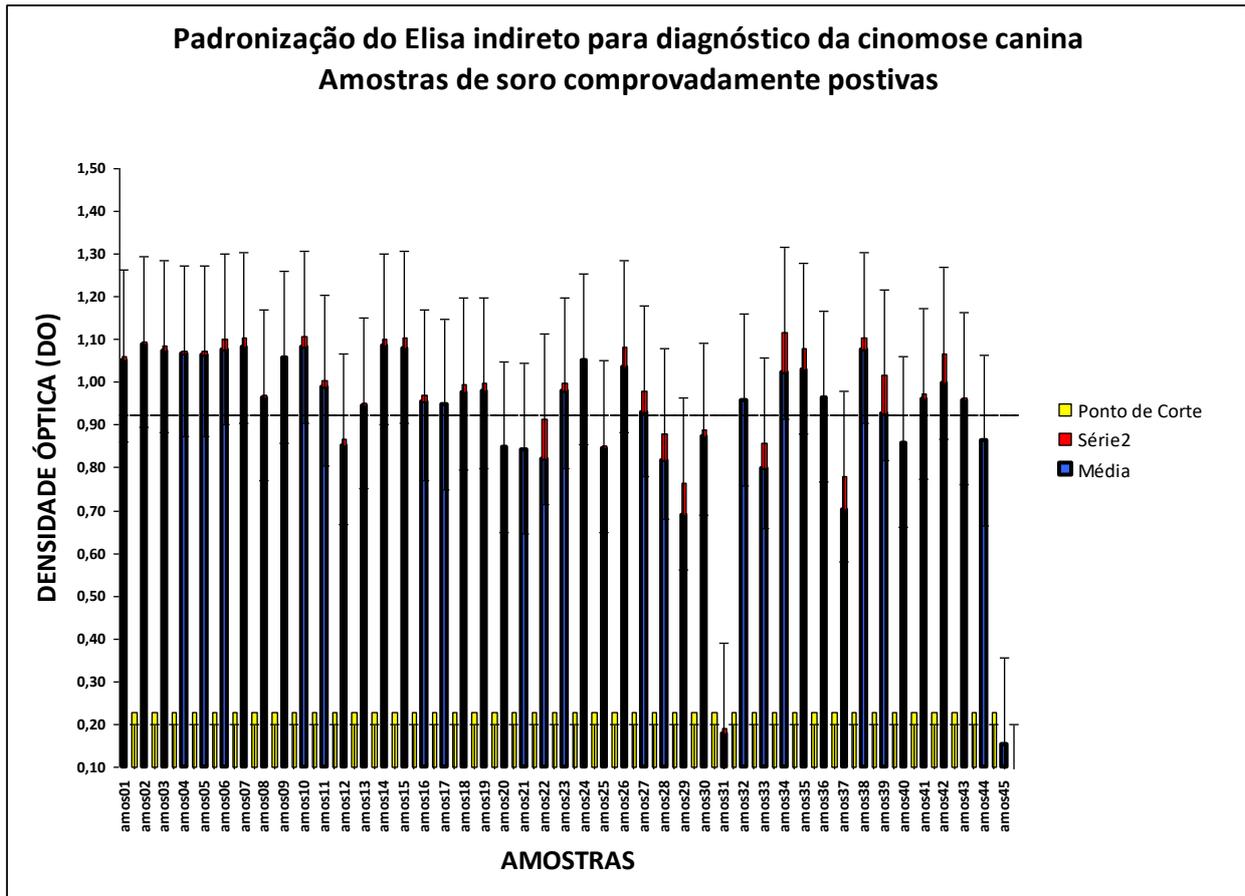
DILUIÇÃO EM:

	1:50		1:100		1:200		1:400		1:800		1:1600	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Branco 50µl	Branco 100µl										
B	Branco 50µl	Branco 100µl										
C	Negat. 50µl	Negat. 100µl										
D	Negat. 50µl	Negat. 100µl										
E	Posit. 50µl	Posit. 100µl										
F	Posit. 50µl	Posit. 100µl										
G	Soro Teste 50µl	Soro Teste 100µl										
H	Soro Teste 50µl	Soro Teste 100µl										

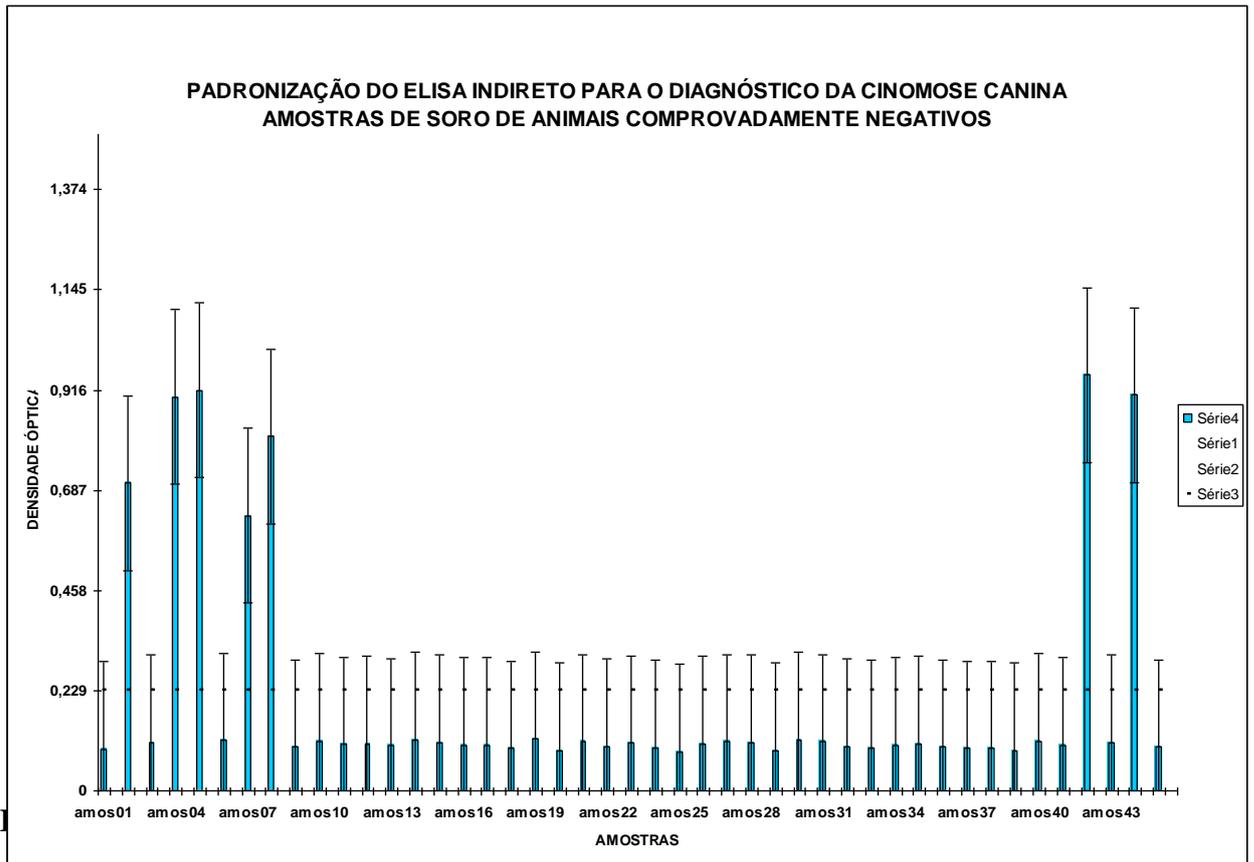
**Figura 1** - Mapa com a diagramação das diluições e padronizações quantitativas por poço da utilização do antígeno do teste ELISA indireto no diagnóstico da cinomose canina.



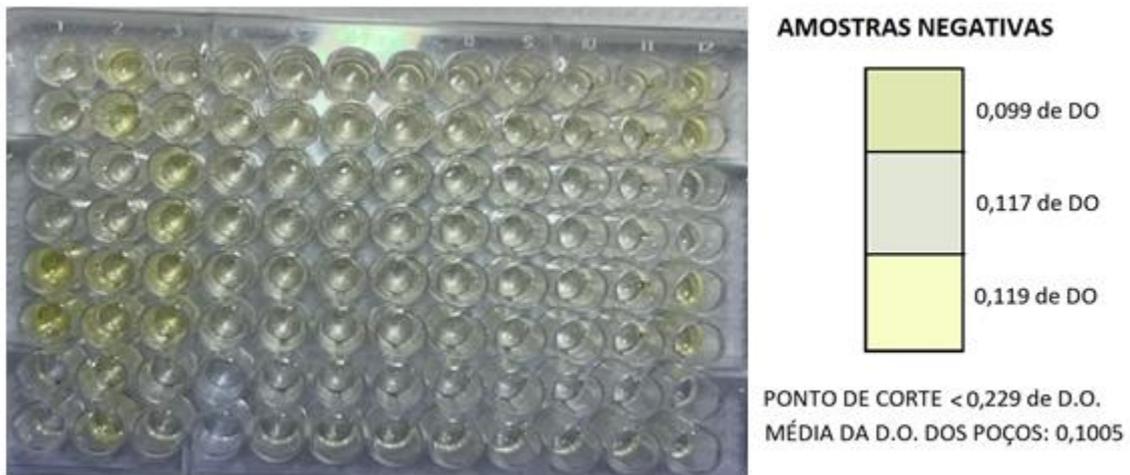
**Figura 2:** Resultados da titulação do antígeno utilizado para padronização do ELISA indireto para o diagnóstico da cinomose canina. Nessa etapa foi determinado também diluição do conjugado e diluição da amostra teste, sendo o conjugado 1:15000 e soro teste 1:200.



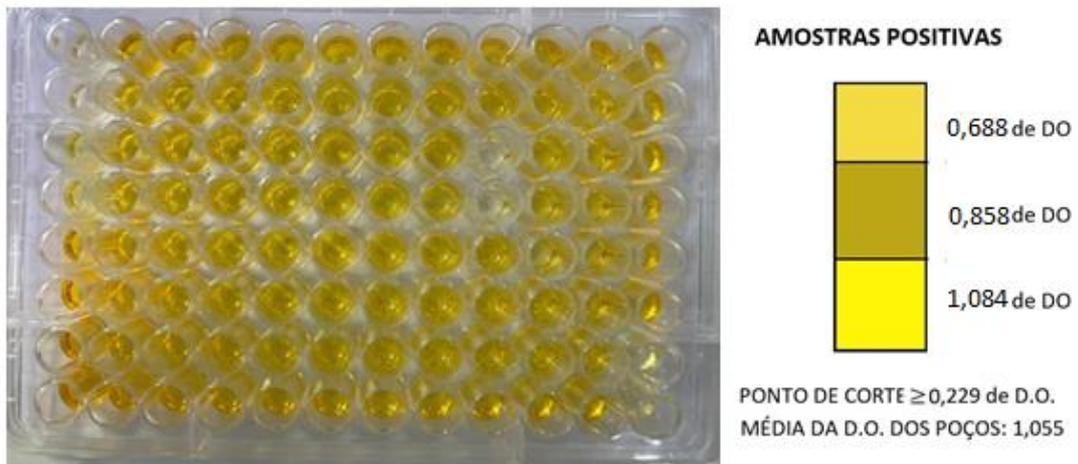
**Figura 3:** Resultados do teste ELISA indireto aplicado em amostras de cães diagnosticados como positivos para cinomose canina clínica e sorologicamente utilizando um teste ELISA comercial.



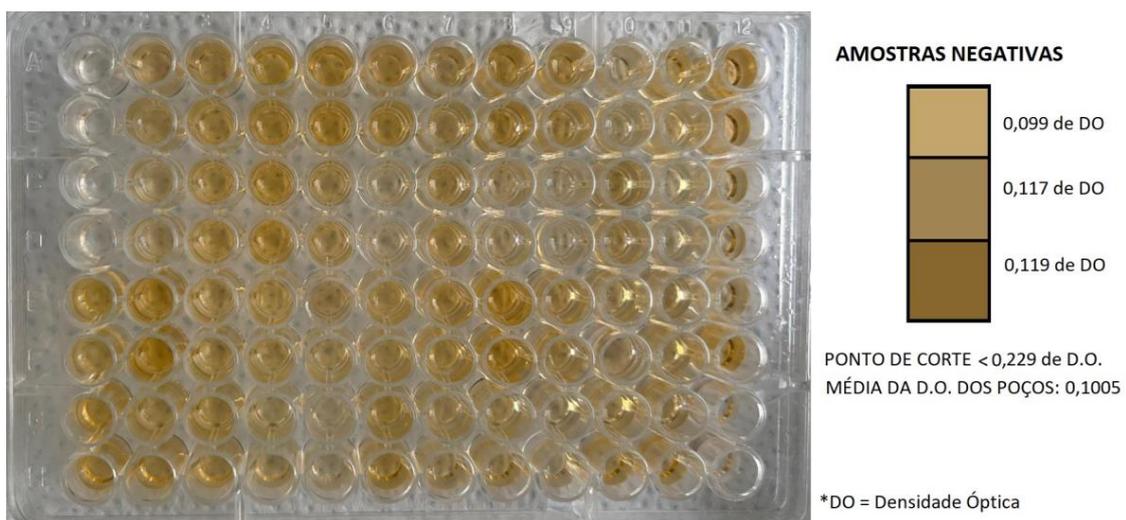
clínica e sorologicamente negativos para cinomose canina.



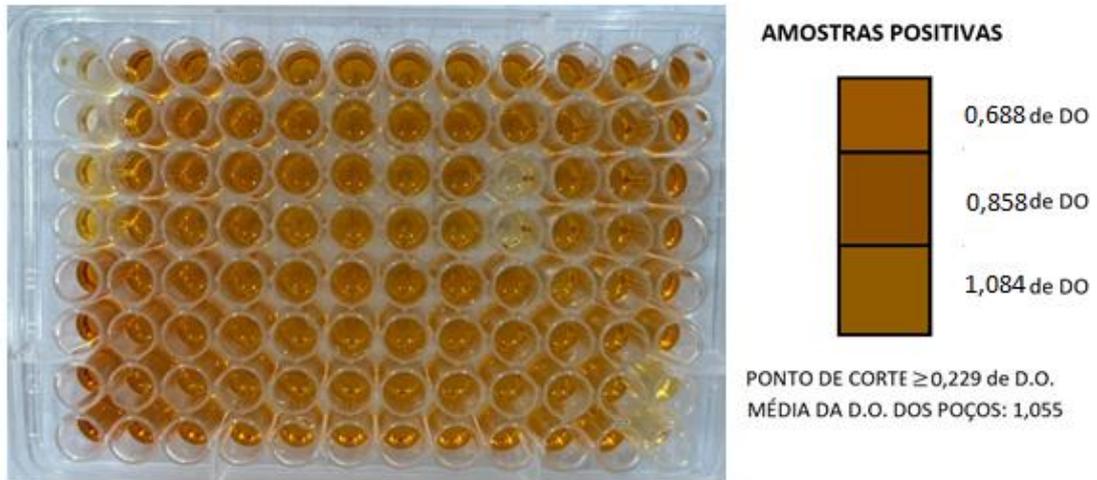
**Figura 5-** Amostras de soro canino de animais comprovadamente negativos para cinomose canina. Amostras submetidas ao ELISA indireto sem frear com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.



**Figura 6-** mostras de soro canino de animais comprovadamente positivos para cinomose canina. Amostras submetidas ao ELISA indireto sem frear com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.



**Figura 7-** Amostras de soro canino de animais comprovadamente negativos para cinomose canina. Amostras submetidas ao ELISA indireto com freamento com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.



**Figura 8-** Amostras de soro canino de animais comprovadamente positivos para cinomose canina. Amostras submetidas ao ELISA indireto com freamento com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.